

Etienne BEZAULT

**CIRAD - EMVT
INRA - Laboratoire
de Génétique des
Poissons**

Diplôme d'Etudes Supérieures de Sciences Naturelles
Université Pierre et Marie Curie – Paris VI
Année 1998/1999

Etude de la conservation de locus
microsatellites chez les Tilapias et
application à l'analyse de la ségrégation
méiotique chez des hybrides inter-génériques
(*O. niloticus* x *S. melanotheron*)

Responsable de stage :
Xavier Rognon

Enseignants responsables :
Robert Barbault
Abou Sarr

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier ici Xavier Rognon et Bernard Chevassus qui m'ont confié ce travail et m'ont suivi tout au long de sa réalisation.

Je tiens également à remercier René Guyomard ainsi que toute l'équipe du laboratoire de génétique des poissons pour leur accueil.

Merci beaucoup à Angélique Gautier et Stéphane Mauger pour leur aide précieuse ainsi qu'à Sophie Launey et Karim Gharbi pour leurs conseils avisés et le temps qu'ils ont su me consacrer.

Je ne voudrais pas oublier l'équipe de la serre aquacole du CIRAD de Montpellier qui m'a fourni le matériel biologique nécessaire à cette étude.

Mes remerciements vont ensuite aux personnes qui m'ont soutenu dans mes projets notamment Rolland Billard, qui m'a guidé dans cette voie, et tous ceux avec qui j'ai pu travailler auparavant au Muséum et à l'ORSTOM.

Finalement je tiens à remercier ma famille et mes amis, pour leur soutien et leurs encouragements...

Et Florence pour sa patience et son aide qui m'auront été plus que précieuses.

Sommaire

Introduction	4
I - Matériel et Méthodes.....	9
<i>A - Marqueurs Moléculaires : Locus Microsatellites.....</i>	<i>9</i>
<i>B - Matériel Biologique</i>	<i>10</i>
1) Mise au point des locus et amorçage interspécifique.....	10
2) Familles utilisées pour l'étude de la méiose hybride	11
<i>C - Techniques Moléculaires Employées pour l'Analyse de Ségrégation</i>	<i>13</i>
1) Extraction d'ADN.....	13
2) PCR et Electrophorèse.....	13
3) Détermination des tailles alléliques.....	14
<i>D - Analyses Statistiques Employées pour l'Analyse de Ségrégation et de la conservation interspécifique des locus microsatellites.....</i>	<i>14</i>
1) Test de conformité de la ségrégation par rapport aux lois de Mendel	14
2) Contrôle du maintien de l'état hybride du génome lors des ségrégations F1	15
α) χ^2 de conformité.....	16
β) Test des signes.....	16
3) Homogénéité des <i>BackCross</i> réciproques.....	17
4) Analyse des liaisons génétiques (d'après Lorieux 1994)	17
5) Estimation et comparaison des taux de recombinaison.....	18
II - Résultats	20
<i>A - Mise au point d'un panel de microsatellites.....</i>	<i>20</i>
<i>B – Amplification Interspécifique.....</i>	<i>22</i>
<i>C - Typage des Parents</i>	<i>24</i>
<i>D – Etude de la Méiose.....</i>	<i>25</i>
1) Distorsion de ségrégation	25
2) Maintien de l'équipartition des génomes lors de la ségrégation hybride F1	26
3) Homogénéité des <i>BackCross</i>	26
α) Comparaison sexe spécifique des <i>BackCross</i> réciproques	26
β) Comparaison des <i>BackCross</i> homologues	27
γ) Comparaison globale des quatre types de ségrégations hybrides	27
4) Déséquilibre de liaison et taux de recombinaison.....	27
III - Discussion	29
<i>A – Amplification Interspécifique.....</i>	<i>29</i>
<i>B – Etude de la Méiose</i>	<i>31</i>
1) Ségrégation F1 et maintien de l'état hybride du génome.....	31
2) Déséquilibre de liaison	33
Conclusion et perspectives.....	35
Références Bibliographiques	37
ANNEXES :.....	41

Introduction

La famille des Cichlidés regroupe plus de 1200 espèces tropicales d'eau douce ou saumâtre, principalement originaires d'Afrique, d'Amérique Centrale et du Sud, ainsi que pour quelques espèces, de Madagascar et d'Asie (Inde, Sri-Lanka, Syrie et Iran). Les Cichlidés appartiennent à l'ordre des Perciformes et sont caractérisés principalement par la présence d'une seule paire de narines, d'une nageoire dorsale continue entre les rayons épineux et mous, d'une ligne latérale interrompue ainsi que par la présence de « mâchoires pharyngiennes » évoluées à partir des premiers arcs branchiaux (Nelson, 1984). De plus les comportements de reproduction et de défense des alevins sont très développés et diversifiés chez ces poissons (Fryer & Iles, 1972). Ceux-ci peuvent être regroupés en trois modes d'organisation : les pondeurs sur substrat, les incubateurs buccaux et, dans une moindre part, ceux qui représentent un état intermédiaire entre les deux comportements précédents, avec ponte sur le substrat et prise en bouche des alevins (incubation larvophile).

Au sein de cette famille, les tilapias constituent un ensemble de 70 espèces originaires d'Afrique (mais absentes de Madagascar) et présentes jusqu'au bassin du Jourdain (Teugels & Thys van den Audenaerde, 1992 ; Thys van den Audenaerde, 1969 ; Trewavas & Teugels, 1992 a et b). Ils présentent une très forte plasticité et diversité de régime alimentaire (omnivores, détritivores, phytoplanctophages et macrophytophages) et de niche écologique, allant des eaux continentales (*Tilapia zillii*, *Sarotherodon galilaeus* ou *Oreochromis niloticus*) aux zones lagunaires (*Oreochromis mossambicus* et *Sarotherodon melanotheron*) et même aux sources d'eau chaude (jusqu'à 38°C) pour *O. niloticus sugutae*.

Leur classification a subi de nombreux remaniements depuis que Regan (cité dans Trewavas, 1983) a différencié le groupe des tilapias de celui des haplochromis sur des bases ostéologiques. Pour la suite de notre étude, nous nous référerons à celle proposée par Trewavas (1982 ; 1983) basée sur des caractères morphométriques, méristiques ainsi que sur des différences comportementales. Ainsi les espèces anciennement regroupées sous le seul genre *Tilapia* ont été séparées en quatre :

- Le genre *Tilapia*, correspondant à l'ensemble des pondeurs sur substrat, soit quelques 30 espèces réparties en 3 à 6 sous-genres (Thys van des Audenaerde, 1969).
- Le genre *Sarotherodon*, comprenant une dizaine d'espèces pratiquant l'incubation buccale paternelle ou biparentale et réparties en 4 groupes.

- Le genre *Oreochromis*, pratiquant l'incubation buccale maternelle, avec environ 30 espèces et 5 sous-genres.
- Le genre *Danakilia* genre monospécifique dont le mode de reproduction de l'espèce type (*Danakilia franchetti*) n'est pas connu.

D'autre part les tilapias sont un groupe d'importance majeure pour l'aquaculture tropicale avec une production de plus de 600.000 tonnes/an (3^{ième} groupe mondial), correspondant principalement à l'espèce *O. niloticus*, le tilapia du Nil. Toutefois d'autres espèces sont également élevées, comme *O. mossambicus* et *Oreochromis aureus*. Enfin, de nombreux hybrides interspécifiques, viables et fertiles, ont été obtenus, essentiellement au sein du genre *Oreochromis*. Ceci a permis d'une part la production de populations monosexes mâles par croisement entre espèces présentant des déterminismes sexuels différents (hétérogamétie mâle et femelle), présentant des taux de croissance et de conversion supérieurs à ceux des femelles et même des populations mixtes à cause de l'absence de comportement reproducteur (Hulata *et al.*, 1983), et d'autre part la sélection de souches de couleur rouge, plus attrayantes, comme le Red Florida (obtenu à partir de croisements complexes entre *Oreochromis urolepis hornorum* et *O. mossambicus* et introgression de *O. niloticus* et *O. aureus* (Brummett *et al.*, 1988)), permettant de concurrencer le marché de certains poissons marins (Lutjanidés).

La possibilité d'amélioration génétique des espèces domestiques est un aspect intéressant de l'hybridation. En effet par croisement d'espèces il est possible de recombinaison des caractères zootechniques intéressants pouvant mener à la création de souches présentant une combinaison de ces caractères. Cependant les résultats obtenus en hybridation chez les différents groupes de poissons utilisés en aquaculture se sont révélés assez limités dans la mesure où les performances zootechniques de ces hybrides n'excèdent que rarement celles de la meilleure espèce parentale. On peut néanmoins citer quelques exemples comme le « bester » chez les esturgeons ou le « tiger » chez les Salmonidés (Blanc et Chevassus, 1986). Ainsi, chez les poissons, les rares cas où la fertilité F1 a permis l'obtention de générations ultérieures (F2, ..., Fn) ou différents types de *BackCross*, n'ont pas ou peu fait l'objet d'analyses permettant d'évaluer d'une part l'intérêt de ces animaux pour l'amélioration génétique et d'autre part la structure précise de leurs génomes. Or chez plusieurs familles de poissons (Poecilidés, Cyprinidés) ou d'amphibiens (genre *Rana*), des cas de méioses anormales montrant une élimination partielle ou totale de l'un des génomes parentaux lors de la première génération ou ultérieurement, ont été décrits (Chevassus, 1998).

En effet les cas d'hybridation naturelle ont montré quatre types de phénomènes s'écartant de la reproduction sexuée classique :

- 1) La production de gamètes non réduits, diploïdes, possédant la totalité des génomes des deux espèces parentales. Ce mécanisme conduit après fécondation avec des gamètes haploïdes à des individus triploïdes généralement stériles ou avec des gamètes diploïdes à des individus tétraploïdes viables et fertiles, formant une nouvelle population isolée pouvant conduire jusqu'à la spéciation. Ce qui est le cas supposé chez les amphibiens pour *Hyla Chrysoscelis* (diploïde) et *H. versicolor* (Tétraploïde) (D. Casanne, *comm. pers.*)
- 2) La suppression de la syngamie. Dans ce cas la fusion des pronucléus ne se produit pas et le pronucléus mâle est éliminé. Ceci revient donc à une gynogénèse. Dans le cas de gamètes réduits, l'individu haploïde qui se développe est inviable. C'est pourquoi ce phénomène est généralement associé à la production de gamètes non réduits, ce qui conduit à une reproduction clonale de type gynogénétique, comme c'est le cas pour *Poecilia formosa* dont les ovocytes nécessitent pour se développer une activation par un spermatozoïde d'une espèce proche qui est éliminé (Hubbs & Hubbs, 1932).
- 3) La réduction de la recombinaison. Dans certains cas la différence structurale du génome des deux espèces peut entraîner une absence totale de recombinaison ce qui conduit à la production de gamètes haploïdes possédant une combinaison de chromosomes non recombinés de chacune des espèces parentales. Ainsi la garniture chromosomique des gamètes réduits présente une distribution allant de 50% de chromosomes de chaque espèce parentale à 100% de chromosomes de l'une d'elles. Du point de vue du pool génique transmis dans ce cas on observe une équité-représentation des génomes parentaux. Cependant l'état hybride du génome des descendants est très variable. Ce processus peut être à l'origine de phénomènes d'introgession entre génomes des espèces pures d'autant plus facilement que l'absence de recombinaison est partielle.
- 4) La réalisation de méiose sélective. Au cours de la méiose, le génome d'une des espèces parentales va être éliminé préférentiellement de manière partielle ou totale. Ce cas s'observe généralement pour le génome d'origine paternel. Ce phénomène connu sous le nom d'hybridogénèse a été décrit chez des femelles hybrides de *Poeciliopsis* (Miller & Shultz, 1959 et Schultz, 1969) qui ne produisent que des ovules haploïdes contenant uniquement le génome de l'espèce maternelle *P. monacha*. Ces ovocytes peuvent être fécondés par des spermatozoïdes de *P. monacha* pour donner des

individus purs de l'espèce maternelle (Schultz, 1980) ou par des spermatozoïdes de *P. lucida* ou *P. occidentalis* produisant à nouveau des hybrides F1 monosexués.

Cependant ces phénomènes ne sont pas stricts et des cas de méioses classiques sont tout à fait envisageables.

Récemment, un hybride inter-générique, viable et fertile (au moins pour les F1 et F2), a été produit artificiellement et pour la première fois dans les 2 sens de croisement, par le CIRAD-EMVT entre *Oreochromis niloticus* et *Sarotherodon melanotheron*.

Cet hybride constitue un modèle original et adapté à l'analyse de l'association et de la ségrégation de caractères parentaux chez des hybrides du fait des nombreuses différences entre les 2 espèces parentales (croissance, reproduction et comportement parental, alimentation et résistance à la salinité,...). Plus particulièrement, la croissance est respectivement forte chez *O. niloticus* et faible chez *S. melanotheron* et les capacités d'adaptation à des eaux salées considérables chez *S. melanotheron* (inféodé aux eaux saumâtres et salées jusqu'à 110‰) sont faibles chez *O. niloticus* (maximum 10-20‰). Pour ces 2 caractères, l'analyse d'hybrides F1 (*O. mossambicus* x *O. niloticus* pour la salinité et *O. niloticus* x *S. melanotheron* pour la croissance) révèle des performances intermédiaires de l'hybride par rapport aux espèces parentales (Toguyeni et al., 1997). La recherche de souches résistantes en milieu salé constitue pour de nombreux pays en développement (en particulier l'Asie du Sud-Est), un enjeu majeur pour les dix prochaines années ; la faisabilité de création de telles souches par hybridation et sélection génétique sera donc analysée dans le cadre de cette étude.

En effet, l'étude directe des possibilités de ségrégation et de réassociation de caractères d'intérêt zootechnique (croissance, adaptation à la salinité, comportement reproducteur) est une démarche longue et coûteuse, nécessitant des installations expérimentales importantes. C'est pourquoi il est intéressant d'essayer de décrire à l'aide de marqueurs moléculaires le devenir du génome hybride au-delà de la génération F1.

Le projet d'Hybridation Intergénérique des Tilapias (HIT) cherchera à mieux comprendre l'association et la ségrégation de gènes parentaux chez des hybrides qui, outre un possible rôle dans la genèse de nouvelles espèces, constituent des génotypes originaux dont le potentiel reste en grande partie à explorer.

Afin d'étudier la ségrégation méiotique de ces hybrides, des marqueurs de type microsatellites ont été adoptés. Ces séquences, constituées de répétitions en tandem de motifs de 1 à 5 nucléotides présentent de nombreux avantages :

- (1) Ils présentent des taux de polymorphisme, dû à la variation du nombre de répétitions, qui peuvent être très importants au niveau intra-spécifique ;
- (2) Les régions flanquantes de ces locus sont très bien conservées entre individus, ce qui permet de considérer ces marqueurs comme locus-spécifiques, ainsi que dans une moindre mesure entre espèces, ce qui permet, grâce à des amorces définies pour une espèce, de tenter une amplification hétérologue chez des espèces apparentées (Primmer *et al.*, 1996 et Primmer & Ellegren 1998) ;
- (3) Ces marqueurs présentent une distribution relativement uniforme sur l'ensemble du génome, ce qui permet une bonne couverture de celui-ci ;
- (4) Ils sont assez nombreux ;
- (5) Ils présentent un caractère codominant (le phénotype observé reflète directement le génotype de l'individu) ;
- (6) La facilité d'amplification et d'identification des allèles par PCR (Polymerase Chain Reaction) font de ces marqueurs des outils très performants et facilement accessibles et transférables (publication des séquences des amorces).

Tous ces avantages ouvrent de grandes perspectives en ce qui concerne l'étude de ségrégation hybride, la cartographie comparée ou l'évolution et la génétique des populations (Estoup & Angers, 1998).

Le travail présenté ici se place dans le cadre de ce programme d'Hybridation Intergénérique chez les Tilapias. Il porte sur :

- (1) Le choix et la mise au point de marqueurs moléculaires (locus microsatellites) ;
- (2) L'amplification hétérologue de ces marqueurs chez les autres espèces de Tilapiinés ;
- (3) L'étude de la ségrégation méiotique chez les hybrides F1 issus du croisement entre les deux espèces *O. niloticus* et *S. melanotheron*.

I - Matériel et Méthodes

A - Marqueurs Moléculaires : Locus Microsatellites

Les marqueurs microsatellites utilisés pour notre étude ont été choisis parmi près de 130 locus clonés chez *Oreochromis niloticus* par Lee et Kocher (1996), dont 62 ont été cartographiés et regroupés en 24 groupes de liaisons (Kocher *et al.*, 1998). Ceux-ci sont disponibles dans les banques de gènes (GENBANK) ainsi que sur le site Internet (<http://tilapia.unh.edu>).

Sur ce site, sont disponibles pour chacun des marqueurs, en plus des informations propres aux marqueurs telles que leur séquence ainsi que celles de leurs amorces, les résultats des tests d'amplification d'ADN réalisés grâce à ces dernières et portant sur trois espèces, *O. niloticus* l'espèce de clonage, *O. aureus* espèce congénérique proche et un Cichlidés haplochrominien du lac Malawi appartenant au genre *Melanochromis*.

Le choix des locus a été réalisé selon deux critères principaux :

- (1) L'amplification ainsi que le polymorphisme de ces marqueurs sur l'ensemble des trois espèces testées, car les marqueurs choisis devront être suffisamment conservés pour être amplifiés chez 2 espèces appartenant à des genres différents tout en étant polymorphes.
- (2) Leur position sur la carte génétique de *O. niloticus* établie par Kocher *et al.* (1998) afin d'établir un panel de marqueurs réparti sur l'ensemble du génome de *O. niloticus*, en insistant sur certains groupes de liaisons pour lesquels plusieurs marqueurs ont été sélectionnés. Nous testerons la répartition de ceux-ci le long du génome de *S. melanotheron*, afin de montrer une distribution quasi-identique (ou non) des marqueurs chez ces deux espèces.

Un panel initial de 41 marqueurs microsatellites a été sélectionné. La liste de ces locus est donnée en annexe 1.

B - Matériel Biologique

1) Mise au point des locus et amorçage interspécifique

Dans le but de caractériser une méiose hybride par rapport à la méiose pure, l'amorçage interspécifique des marqueurs préalablement sélectionnés se révèle indispensable.

A cause de l'éloignement des deux espèces parentales, appartenant à des genres distincts, et de l'extension du programme d'hybridation à d'autres espèces de tilapias, avec notamment le démarrage d'un programme d'hybridation entre *O. niloticus* et *O. mossambicus* aux Philippines, des tests d'amorçage interspécifique ont été réalisés sur un large panel d'espèces de tilapias et d'autres Cichlidés africains, en prenant un échantillon de 5 individus par espèce (sauf pour *O. niloticus* où n=16, *S. melanothron* n=6 et *Tilapia guineensis* n=4). Ce panel comprend 16 espèces :

- 13 tilapias :
 - 8 *Oreochromis*, appartenant à 2 sous-genres :
 - *Oreochromis* (5 espèces)
 - *Nyasalapia* (3 espèces)
 - 2 *Sarotherodon*
 - 3 *Tilapia* (appartenant au groupe *Coptodon*)
- 3 autres espèces de Cichlidés africains :
 - *Chromidotilapia guntheri*
 - *Hemichromis bimaculatus*
 - *Haplochromis* sp. « rockkribensis » du lac Victoria

Le tableau 1 donne la liste des espèces étudiées ainsi que leur origine.

Genre (sous genre)	espèce	sous-espèce	Bassin	Localité	Statut	n =
<i>Oreochromis</i>						
<i>O. (Oreochromis)</i>	<i>aureus</i>		Nil	Lac Manzalla	E	5
<i>O. (Oreochromis)</i>	<i>mossambicus</i>		Mozambique		<u>E</u>	<u>5</u>
<i>O. (Oreochromis)</i>	<i>niloticus</i>	<i>niloticus</i>	Bouaké		<u>A</u>	<u>16</u>
<i>O. (Oreochromis)</i>	<i>shiranus</i>		Lac Malawi		S	5
<i>O. (Oreochromis)</i>	<i>urolepis</i>	<i>hornorum</i>	Bouaké		A	2
<i>O. (Nyasalapia)</i>	<i>macrochir</i>	<i>mweruensis</i>	Bouaké		A	5
<i>O. (Nyasalapia)</i>	<i>saka</i>		Lac Malawi		S	5
<i>O. (Nyasalapia)</i>	<i>squammi pinnis</i>		Lac Malawi		S	5
<i>Sarotherodon</i>						
<i>S. (Sarotherodon)</i>	<i>galilaeus</i>	<i>galilaeus</i>	Niger	Bamako/Djk	S	5
<i>S. (Sarotherodon)</i>	<i>melanotheron</i>	<i>melanotheron</i>	Côte d'Ivoire	Lagune Ebrié	<u>E</u>	<u>6</u>
<i>Tilapia</i>						
<i>T. (Coptodon)</i>	<i>Dageti</i>		Niger	Bamako/Djk	S	5
<i>T. (Coptodon)</i>	<i>Guineensis</i>		Côte d'Ivoire	Lagune Ebrié	S	2
			Sénégal	Djoudj	S	2
<i>T. (Coptodon)</i>	<i>zillii</i>		Nil	Lac Manzalla	E	5
			Sassandra	Dosso	S	1
Autres cichlidés africains						
<i>Hemichromis</i>	<i>bimaculatus</i>		Côte d'Ivoire	Bandama/Kan	S	5
<i>Chromidotilapia</i>	<i>guntheri</i>		Niger	Bamako	S	2 - 3
<i>Haplochromis</i>	<i>sp. "rockkribensis"</i>		Bassin du Victoria		Aq	2 - 3

Tableau 1 : Liste des espèces étudiées lors des tests d'amorçage interspécifique : localité , statut (S=population sauvage, E=population expérimentale, A=souche d'aquaculture et Aq=animaux d'aquarium), et nombre d'individus ; les espèces impliquées dans le programme HIT sont soulignées.

2) Familles utilisées pour l'étude de la méiose hybride

L'étude de la méiose hybride (*O. niloticus* x *S. melanotheron*) a été réalisée pour les quatre types d'animaux hybrides : mâle et femelle F1(NM) (femelle *O. niloticus* x mâle *S. melanotheron*) et mâle et femelle F'1(MN) (femelle *S. melanotheron* x mâle *O. niloticus*)

Dans le but de caractériser pleinement la méiose hybride (*O. niloticus* x *S. melanotheron*), la ségrégation méiotique des hybrides réciproques (F1 et F'1) et des deux sexes, a été étudiée à partir de leur descendance.

Pour cette étude, des fratries de type *BackCross* (croisement en retour) ont été préférées à celles de type F2, car n'ayant pas d'informations préalables quant à la variabilité des marqueurs, les pertes d'informativité dues à l'impossibilité d'assigner l'origine parentale des

allèles observés chez les descendants devaient être minimisées. De plus les fratries de type *BackCross* permettent dans chaque fratrie de posséder un témoin interne de ségrégation pure *O. niloticus*. Ceci est également un point positif dans le cas de méioses mâle et femelle différentes (ou anormales). Ceci permettra de pouvoir comparer les résultats obtenus entre ségrégation hybride et pure pour chaque sexe (a priori) ; ainsi qu'avec ceux de cartographie obtenus par Kocher *et al.* (1998).

Aussi quatre fratries *BackCross* (BC) réciproques sur *O. niloticus* ont été analysées pour l'étude de la ségrégation méiotique des quatre types d'hybrides :

- F1 x N : BC2 ;
- N x F1 : BC3 ;
- F'1 x N : BC9 ;
- N x F'1 : BC5bis.

A cela il faut ajouter une fratrie pure *S. melanotheron* qui constituera un témoin pour la ségrégation et l'étude des liaisons entre les marqueurs, puisque la carte génétique de Kocher *et al.* (1998) n'a été établie que par rapport à *O. niloticus* (femelle).

L'effectif étudié pour chaque famille analysée est de 50 individus. Les généalogies et les types de croisement mis en jeu sont donnés en annexe 2.

De plus il est à noter que des distorsions de ségrégation ont été rapportées récemment pour certains locus microsatellites, UNH 111, 159 et 216 ainsi que des phénomènes de duplication chez certaines espèces pour le premier de ces marqueurs (Palti *et al.*, 1999). Ces ségrégations pures pourront, entre autres choses, confirmer ou infirmer ces hypothèses.

Toutes les fratries utilisées lors de cette étude ont été élevées dans la serre aquacole du CIRAD-EMVT à Montpellier.

C - Techniques Moléculaires Employées pour l'Analyse de Ségrégation

1) Extraction d'ADN.

L'extraction d'ADN de chaque individu a été réalisée au Phénol d'après le protocole décrit par Estoup *et al.* (1993) et donné en annexe 3.

Ces extractions ont été menées à partir d'échantillons de muscle congelé ainsi que de nageoire, de foie ou d'alevins entiers conservés dans l'éthanol absolu.

2) PCR et Electrophorèse

A partir de l'ADN précédemment extrait, les locus microsatellites ont été amplifiés par PCR dans un volume total de 10µl par tube contenant 2µl de solution d'ADN à une concentration d'environ 20ng/µl, 75µM de dNTP, 20nM d'amorce marquée en 5' au $\gamma^{33}\text{P}$ à l'aide de T4 polynucléotide kinase (Biolabs), 400nM de l'autre amorce non marquée, 20µg/ml de BSA (*Bovine Serum Albumin*), 0,8 à 2 mM de MgCl_2 , 1X tampon et 0,25 unités de Taq Polymérase (Promega).

Les PCR ont été réalisées suivant le programme indiqué : après une phase initiale de dénaturation de 5 min à 96°C, l'amplification est réalisée sur une série de 30 cycles comprenant une phase de dénaturation de 30 secondes à 95°C (portée à 1 min à 96°C pour les 5 premiers cycles), une phase d'appariement des amorces (*annealing*) de 30 secondes à température optimisée pour chaque locus (T_m , 48 à 60°C) et une phase d'élongation de 30 secondes à 72°C. La PCR s'achève par une phase d'élongation finale de 5 min à 72°C.

L'électrophorèse des produits de PCR est réalisée après ajout de 4µl par tube de colorant de chargement contenant de la formamide qui a la propriété d'abaisser la température de renaturation de l'ADN, et dénaturation pendant 4 min à 96°C. 2µl de produit sont alors chargés sur gel de séquence à 6% d'acrylamide. Le temps de migration (en Volt-heure) est déterminé par rapport à la taille attendue du fragment amplifié. Il est proportionnel à la taille de ce fragment. Après séchage, le gel est mis en exposition sur film auto-radiographique.

3) Détermination des tailles alléliques

Celle-ci est réalisée en faisant migrer sur un même gel les produits de PCR et une séquence connue. On obtient ainsi la taille en paire de base (pb) des allèles amplifiés.

Pour cela on réalise le séquençage du bactériophage M13, constitué d'ADN circulaire simple brin et spécifique de *Escherichia coli*. En utilisant comme site d'amorçage une portion de la séquence adjacente en 3' au site de clonage (polylinker), identique chez tous les vecteurs M13, grâce à une amorce complémentaire de celle-ci commercialisée sous le nom d'« amorce universelle » (M13PU), on réalise le séquençage du phage.

Le séquençage est réalisé suivant la technique de Sanger (didésoxynucléoside triphosphate) avec le kit fmol DNA Sequencing System (Promega) : Dans quatre tubes de PCR, un pour chacun des quatre nucléotides (G, A, T et C), sont ajoutés 2µl du d/ddNTP approprié (désoxynucléotide/didésoxynucléotide triphosphate aux concentrations fournies dans le kit), 50ng d'ADN contrôle (pGEM-3Zf(+)), 5ng d'amorce M13Pu marquée en 5' au $\gamma^{33}\text{P}$ avec la T4 Polynucléotide Kinase, 5X de tampon et 1.25 unités de Taq DNA Polymerase. Après une dénaturation initiale de 2 minutes à 95°C, la réaction de séquence est effectuée sur 30 cycles comprenant une phase de dénaturation de 30 secondes à 95°C, une phase d'appariement de 30 secondes à 42°C et une phase d'élongation d'une minute à 70°C. Le protocole de séquençage est détaillé en annexe 4.

D - Analyses Statistiques Employées pour l'Analyse de Ségrégation et de la conservation interspécifique des locus microsatellites

1) Test de conformité de la ségrégation par rapport aux lois de Mendel

Lors d'une méiose normale, le phénomène d'appariement et de disjonction des chromosomes homologues aboutit à la création de gamètes possédant un chromosome de chaque paire et à chaque locus un allèle de l'un ou l'autre parent. De ce fait on attend chez les descendants une équiprobabilité de présence des 2 allèles des parents à chaque locus. Ceci correspond à la ségrégation mendélienne. La vérification de cette équiprobabilité de la ségrégation des allèles, ou au contraire la mise en évidence de phénomènes de distorsion lors

de la méiose et/ou après fécondation, est importante pour l'étude et la compréhension des phénomènes méiotiques, à plus forte raison encore dans le cas d'hybrides.

Le test du χ^2 de conformité permet de tester l'ajustement des données à une distribution théorique attendue. Pour cela on compare les effectifs observés dans chaque classe génotypique aux effectifs théoriques calculés sous l'hypothèse de ségrégation mendélienne individuelle de chaque locus ($H_0 : P_{allèle1}=P_{allèle2}=0,5$).

Ceci revient à effectuer un test de χ^2 de conformité à 1 degré de liberté (d.d.l.).

$$\chi^2_{calc} = \frac{\sum (\text{effectif}_{obs} - \text{effectif}_{th})^2}{\text{effectif}_{th}}$$

L'hypothèse H_0 est rejetée au seuil $\alpha=5\%$ si le χ^2_{calc} prend une valeur supérieure à 3,84.

Toutefois le seuil de 5% doit être corrigé dans le cas de tests multiples afin d'être plus conservatif et de diminuer le nombre de tests faussement significatifs.

Ainsi la correction séquentielle de Bonferroni décrite par Rice (1989) a été réalisée. Celle-ci permet, par une technique non-paramétrique, de s'affranchir de l'indépendance des tests.

Pour cela les probabilités de chaque test doivent être classées par rang croissant de P_1 à P_k . On considère tout d'abord la plus petite valeur de P (P_1). Si $P_1 \leq \alpha/k$ alors on considère le test correspondant comme significatif au seuil α , on rejette donc H_0 . Dans le cas contraire, on considère l'ensemble des tests effectués non significatifs au seuil α , on ne peut donc pas rejeter H_0 . Dans le cas où $P_1 \leq \alpha/k$, on procède de même avec P_2 : Si $P_2 \leq \alpha/(k-1)$ alors on rejette également pour ce test H_0 et on passe par itération au test suivant jusqu'à ce que l'inégalité $P_i \leq \alpha/(k-i)$ ne soit plus vérifiée.

2) Contrôle du maintien de l'état hybride du génome lors des ségrégations F1.

En complément, des analyses prenant en compte de manière globale l'ensemble des locus étudiés ont été effectuées pour déterminer le devenir des génomes parentaux au cours de la méiose des hybrides F1 et F'1 des 2 sexes. En effet dans de nombreux cas d'hybridation, des

phénomènes divers d'exclusion partielle ou totale de l'un des 2 génomes parentaux lors de la seconde génération hybride (méiose F1) ou ultérieurement ont été décrits (Fujiwara *et al.*, 1997).

Ainsi dans le cas de *BackCross* (Hyb(NM) x Pure(NN)), on s'attend à obtenir globalement dans la descendance $\frac{3}{4}$ d'allèle de l'espèce parentale sur laquelle est réalisé le *BackCross* (N) et $\frac{1}{4}$ d'allèle de l'autre espèce parentale (M). Plus simplement, en ne s'attachant qu'aux allèles transmis par le parent hybride, une équi-représentation des allèles de chacune des espèces parentales est attendue.

A l'inverse, le non respect de ces proportions montre l'élimination préférentielle d'allèles de l'une des 2 espèces qui peut mener à plus ou moins long terme à la perte de l'état hybride.

α) χ^2 de conformité.

Le respect de ces proportions a tout d'abord été testé grâce à un χ^2 de conformité à 1 d.d.l. pour chaque ségrégation hybride en sommant sur l'ensemble des locus le nombre d'allèles observés hérités de chaque espèce sous l'hypothèse H_0 :

$$n_{\text{allèles N}} = n_{\text{allèles M}}$$

β) Test des signes

Le test des signes décrit par Dugue et Delaporte (1973) est un test non paramétrique qui prend en compte pour chaque locus le signe de la différence ($n_{\text{allèles N}} - n_{\text{allèles M}}$) et non la valeur de cette différence. Ceci pour permettre d'observer même les écarts faibles à la distribution attendue.

On dispose de n (nombre de locus) paires d'observations N_i et M_i (respectivement nombre d'allèles *O. niloticus* et nombres d'allèles *S. melanotheron* observés au locus i).

On considère uniquement le signe (+ ou -) de la différence ($N_i - M_i$).

On réalise un test bilatéral sous l'hypothèse H_0 ($N=M$).

Soit k l'effectif constaté pour le signe (+ ou -) dont la fréquence est la plus faible ($k < n/2$). L'hypothèse est rejetée si k est au plus égal au nombre c lu dans la table pour le seuil de signification α désiré, avec c plus grand nombre entier tel que :

$$\sum_{i=0}^c \frac{C_n^i}{2^n} \leq \alpha$$

Les cas pour lesquels l'équi-représentation des allèles est stricte ($N_i - M_i = 0$) sont écartés de ce test car ils ne peuvent être impliqués dans ce type de test qui ne considère dans sa variable de décision que les observations s'écartant de l'état attendu.

3) Homogénéité des *BackCross* réciproques.

La comparaison des ségrégations hybrides des quatre types génétiques différents a été réalisée afin de savoir si elles pouvaient être considérées comme homogènes malgré la différence de voie (mâle ou femelle) ou de sens de croisement d'origine ($N \times M$ ou $M \times N$). Ce test revient à réaliser une série de χ^2 d'homogénéité à 1 d.d.l., pour chaque locus, entre la distribution des allèles de 2 ségrégations. Le χ^2 global peut être obtenu en sommant les n (nombre de locus) χ^2 à 1 d.d.l.. Ce χ^2 global peut être assimilé à un χ^2 à n d.d.l..

Ceci a été réalisé entre ségrégations réciproques de même sexe ($\text{♀F1} / \text{♀F'1}$ et $\text{♂F1} / \text{♂F'1}$), entre ségrégations d'hybrides homologues de sexes différents ($\text{♀F1} / \text{♂F1}$ et $\text{♀F'1} / \text{♂F'1}$) ainsi qu'entre ségrégations d'hybrides réciproques de sexe opposé ($\text{♂F1} / \text{♀F'1}$ et $\text{♀F1} / \text{♂F'1}$).

De même, un test d'homogénéité impliquant les 4 ségrégations hybrides a été réalisé.

4) Analyse des liaisons génétiques (d'après Lorieux 1994)

Si deux marqueurs pris au hasard dans un génome se trouvent sur des chromosomes différents. Ils présenteront alors des ségrégations indépendantes, ce qui signifie qu'il y aura en moyenne autant de gamètes recombinés que de parentaux. Par contre s'ils se trouvent sur un même chromosome, ceux-ci vont avoir tendance à ségréger ensemble, les allèles ne pouvant être séparés que par un événement de recombinaison se produisant entre ces deux marqueurs (ou un nombre impair d'événements). Ainsi on obtient en moyenne plus de gamètes parentaux que de recombinés. La probabilité de ces événements (*Crossing-Over*) étant proportionnelle à la distance qui sépare les deux marqueurs, la co-ségrégation observée (excédant de gamètes parentaux) est d'autant plus forte que la distance entre les locus est faible.

Afin de tester la liaison entre les locus, le test du *LOD Score* a été utilisé.

Le LOD (*logarithm of the Odds*) est une méthode utilisant des rapports de vraisemblances pour calculer un indice traduisant de « combien » l'hypothèse de liaison est plus (ou moins) probable que celle d'indépendance. Le *LOD score* est égal au logarithme décimal du rapport de vraisemblances des deux hypothèses initiales :

$$LOD_{\max} = \log_{10} \left(\frac{e^L(\hat{r})}{e^L(r_0)} \right)$$

Où (\hat{r}) est l'estimateur du maximum de vraisemblance, $(e^L(\hat{r}))$ la vraisemblance maximale évaluée à \hat{r} et $e^L(r_0)$ la vraisemblance évaluée à $r_0 = 0,5$.

Concrètement cette statistique quantifie le rapport des probabilités des hypothèses d'indépendance génétique et de déséquilibre de liaison au taux de recombinaison le plus probable. Ott (1985) montre que $4,6 LOD_{\max}$ suit une distribution de χ^2 à 1 d.d.l.. Pour une comparaison unique, on peut utiliser un risque de première espèce $\alpha = 5\%$, ce qui correspond à un χ^2 de 3,84 (pour 1 d.d.l.) ou à un LOD_0 de $3,84/4,6 = 0,83$. Mais lors de comparaisons multiples, comme pour la construction d'une carte génétique ou ici l'étude de ségrégation impliquant plusieurs dizaines de marqueurs, un *LOD score* supérieur à 3 ($\alpha = 0,0002$) garantit alors l'existence d'une liaison avec une confiance suffisante.

Le *LOD score* présente l'avantage de réaliser de façon conjointe le test du déséquilibre de liaison et l'estimation du maximum de vraisemblance du taux de recombinaison.

Au cours de cette analyse, le test du *LOD score* est utilisé grâce au programme LINKMFEX (Danzmann, 1999).

5) Estimation et comparaison des taux de recombinaison.

Un estimateur sans biais du taux de recombinaison \hat{r} est fourni par le rapport du nombre de recombinants au nombre total d'individus. Toutefois il est impossible de déterminer quels sont les génotypes recombinants lorsque la phase de liaison entre les allèles est inconnue, lorsque les grands-parents sont non disponibles. Aussi on considère que les haplotypes dont les effectifs sont supérieurs à ceux attendus sous l'hypothèse d'équipartition correspondent aux associations parentales. Les calculs de taux de recombinaison ont été réalisés grâce au

programme LINKMFEX qui tient compte de la classe la plus nombreuse, comme génotype parental, et non de la phase de liaison pour désigner les deux types d'haplotypes.

Les taux de recombinaison obtenus ainsi peuvent être comparés grâce à un test de χ^2 d'indépendance entre effectifs de gamètes parentaux et recombinés pour les différentes liaisons. Ce χ^2 calculé se rapporte à un χ^2 à (n-1) d.d.l., où n est le nombre d'échantillons analysés conjointement (nombre de ségrégations testées).

Les taux de recombinaison entre locus permettent d'estimer les distances génétiques entre ces marqueurs et ainsi de réaliser la cartographie du génome de ces espèces. Toutefois la distance génétique séparant 2 marqueurs ne peut être directement déduite de l'estimation du taux de recombinaison. En effet, seules les recombinaisons impaires (simple, triple *Crossing-Over*) sont prises en compte. Les recombinaisons paires (double, quadruple *Crossing-Over*), quant à elles, sont « masquées », ce qui entraîne une sous-estimation de la distance entre les 2 marqueurs.

Cependant il est à noter que la présence d'un *Crossing-Over* tend à empêcher la réalisation d'un autre événement de recombinaison dans la même région (Weir, 1990). Ceci correspond à la notion d'interférence génétique.

Un haut degré d'interférence est généralement constaté chez les poissons car ils possèdent des chromosomes de petite taille ce qui gêne la réalisation de plusieurs *Crossing-Over*. Ceci implique l'utilisation d'un modèle à interférence totale $x(r) = r$ ou du modèle à forte interférence déterminé par Kosambi en 1944 :

$$x(r) = \frac{1}{4} \ln \left(\frac{1+2r}{1-2r} \right)$$

Pour cette étude nous avons utilisé le modèle à interférence total.

Cependant les données fournies par Kocher *et al.* (1998) lors de l'établissement de la carte génétique (de la voie femelle) de *O. niloticus* sont des distances génétiques calculées grâce au modèle de Kosambi, sans indication du nombre d'individus étudiés. Ceci ne permet donc pas la réalisation de tests statistiques ayant pour but de comparer les taux de recombinaison obtenus ici avec ceux observés par Kocher *et al.* (1998). De plus le manque de données et de réplicats dans notre étude rend la comparaison même qualitative de celles-ci assez difficile.

II - Résultats

A - Mise au point d'un panel de microsatellites

La mise au point de ce panel a été réalisée dans une double optique sur un jeu de départ constitué de 41 marqueurs microsatellites clonés chez *O. niloticus* (Lee & Kocher, 1996) :

- (1) Mise au point optimale pour les 2 espèces concernées par l'hybridation (*O. niloticus* et *S. melanotheron*) et dans une moindre mesure pour *O. mossambicus* également utilisé dans le programme HIT (dans le cadre des expérimentations menées aux Philippines).
- (2) Tester l'amorçage interspécifique (*Cross Priming*) sur un ensemble d'espèces appartenant à trois genres de tilapias ainsi que sur d'autres Cichlidés africains apparentés, soit 16 espèces.

Sept locus (UNH-105, UNH-109, UNH-111, UNH-186, UNH-194, UHN-201 et UNH-223) ont dû être abandonnés dès cette phase car ils ne présentaient pas de pattern clairement interprétable, principalement à cause de mauvaise amplification spécifique ou au contraire de trop forte amplification aspécifique, malgré l'ajustement de la stringence des PCR en jouant sur la température d'appariement et la concentration en magnésium. Ceci porte donc le nombre locus utilisés pour les tests d'amorçage interspécifique à 34.

Lors des tests d'amorçage interspécifique, la stringence des PCR a été diminuée par rapport aux conditions optimales déterminées pour les deux espèces intervenant dans l'hybridation (baisse de la température d'appariement de 2 à 4°C et/ou augmentation de la concentration de magnésium, cofacteur de la réaction de polymérisation). Cette diminution de la stringence permet d'augmenter sensiblement le taux d'amorçage et donc d'amplifier plus facilement les allèles du locus en question chez des espèces apparentées grâce aux amorces de l'espèce de clonage.

Au cours de cette phase, certains locus tels que UNH-135 et UNH-197 ont montré plus de 2 allèles par individu. Bien qu'assez inhabituel, le fait qu'un couple d'amorces spécifiques

puisse amplifier plus de deux allèles de type microsatellite chez un individu diploïde peut être expliqué par deux hypothèses :

- (1) Les individus présentent plusieurs allèles et aucun événement de recombinaison n'est observé (dans leur descendance). Il est assez probable qu'il s'agisse alors d'un phénomène d'écho dû à la présence sur l'une des séquences flanquantes d'un deuxième site d'amorçage. Dans ce cas, pour un allèle génotypique, on observe deux allèles phénotypiques, le plus rapide résultant de l'amplification entre le site d'amorçage unique (Forward ou Reverse) et le site d'amorçage réciproque (respectivement Reverse ou Forward) le plus proche de la séquence microsatellite, le plus lent de celle impliquant le site le plus éloigné. Dans ce cas la différence de taille entre les différents allèles est quasi constante.
- (2) Pour l'espèce en question, le locus amplifié est dupliqué, ce qui implique que le génome de cette espèce possède deux copies distinctes de ce locus dérivant d'un ancêtre commun. Dans ce cas les ségrégations de ces locus, bien que n'étant pas obligatoirement indépendants, présentent généralement des événements de recombinaison. Toutefois des phénomènes de duplication en tandem du locus peuvent avoir lieu. On peut alors n'observer aucune recombinaison ce qui entraîne l'impossibilité de distinguer ce cas de celui d'écho autrement que par séquençage.

Pour la partie de l'étude concernant l'analyse de la ségrégation hybride (*O. niloticus* x *S. melanotheron*), 3 autres locus (UNH-120, UNH-172 et UNH-192) ont été exclus à cause de l'absence d'amplification chez *S. melanotheron*. Ce cas s'est aussi présenté pour *O. mossambicus* avec 1 locus (UNH-125) Enfin UNH-193 a aussi été écarté de cette étude à cause d'une amplification aspécifique trop importante.

De ce fait nous avons pu établir un jeu de 30 marqueurs adaptés à l'étude de notre hybride intergénérique.

D'après la carte génétique établie par Kocher *et al.* (1998) chez *O. niloticus* pour la voie femelle mettant en évidence 30 groupes de liaison dont 24 portant des marqueurs microsatellites, le panel de 30 locus retenu se trouve réparti sur l'ensemble du génome cartographié de l'espèce couvrant 18 groupes de liaison dont 5 avec au moins deux marqueurs. Ces données sont présentées dans le tableau 2.

nombre de marqueurs utilisés par groupe de liaison							locus non-assignés
1		2		3		0	
GL	Locus	GL	Locus	GL	Locus	GL	
2	UNH-159	12	UNH-123	3	UNH-115	1	UNH-117
4	UNH-146		UNH-189		UNH-131	7	UNH-124
5	UNH-149	17	UNH-008		UNH-135	11	UNH-142
6	UNH-154		UNH-103	16	UNH-102	15	UNH-207
8	UNH-129				UNH-125	18	
9	UNH-132				UNH-138	22	
10	UNH-169			23	UNH-130		
13	UNH-173				UNH-197		
14	UNH-106				UNH-216		
19	UNH-162						
20	UNH-174						
21	UNH-190						
30	UNH-211						
Total :		13	2	3		6	4

Tableau 2 : ensemble des groupes de liaison établis chez *O. niloticus* en fonction du nombre de marqueurs appartenant à chacun d'eux utilisés lors de l'étude de la ségrégation hybride.

B – Amplification Interspécifique

Les tests d'amorçage interspécifique effectués sur les 34 locus représentent 499 combinaisons locus/espèce, en exceptant *O. niloticus*. Le taux d'amplification hétérologue global, présentant des allèles de type microsatellites, s'élève à 85% (424 cas).

Dans 349 cas parmi les 458 pour lesquels une amplification a été obtenue (76%), les locus se sont révélés polymorphes au niveau intra-spécifique. L'ensemble des résultats est donné en annexe 5. En décomposant ces données suivant les différents genres établis d'après Trewavas (1983), on obtient les résultats suivants.

Le taux d'amplification observé chez les tilapias est de 91%, 96% pour le seul genre *Oreochromis*, auquel appartient l'espèce de clonage *O. niloticus*, 94% pour le genre *Sarotherodon* et 80% pour le genre *Tilapia*. Les autres espèces de Cichlidés africains étudiées présentent un taux d'amorçage respectif de 41% pour *Hemichromis bimaculatus*, 62% pour *Chromidotilapia guntheri* et 75% pour *Haplochromis sp.* « rockkribensis ».

Pour l'ensemble des tilapias le pourcentage de locus polymorphes observés parmi ceux qui ont montré une amplification hétérologue est de 80%. Chez les espèces du genre

Oreochromis, les locus polymorphes représentent 80% des locus amplifiés contre 92% chez les *Sarotherodon* et 73% chez les *Tilapia*. Les autres représentants des Cichlidés africains montrent les pourcentages de locus polymorphes suivants : 64% chez *H. bimaculatus*, 38% pour *C. guntheri* et 54% pour *H. sp. « rockkribensis »*.

Groupes	Taux d'amplification hétérologue	Taux de polymorphisme
Total	85%	76%
tilapias	91%	80%
<i>Oreochromis spp.</i>	96%	80%
<i>O. (Oreochromis) spp.</i>	96%	81%
<i>O. (Nyasalapia) spp.</i>	95%	77%
<i>Sarotherodon spp.</i>	94%	92%
<i>Tilapias (Coptodon) spp.</i>	80%	73%
<i>Hemichromis bimaculatus</i>	41%	64%
<i>Chromidotilapia guntheri</i>	62%	38%
<i>Haplochromis sp. "rockkribensis"</i>	75%	54%

Tableau 3 : Taux d'amplification et de polymorphisme des locus étudiés chez les 16 espèces impliquées dans les tests d'amorçage interspécifique ; le taux d'amorçage hétérologue ne prend pas en compte l'espèce de clonage *O. niloticus*.

Ainsi du point de vue de la conservation des 34 locus testés :

- 30 amplifient des allèles chez les 3 espèces du programme HIT :
 - 1 amplifie uniquement *O. niloticus* et *S. melanotheron*
 - 2 amplifient uniquement *O. niloticus* et *O. mossambicus*
- sur l'ensemble des espèces étudiées (tilapias et autres Cichlidés) :
 - 5 sont amplifiés chez toutes les espèces
 - 18 le sont chez tous les tilapias
- au sein des trois genres de tilapias :
 - 27 montrent une amplification chez tous les *Oreochromis*, dont 1 uniquement chez eux (UNH-172)
 - 29 chez tous les *Sarotherodon*
 - 23 chez tous les *Tilapia*
 - 1 ne montre d'amorçage chez aucun *Oreochromis* du groupe *Nyasalapia*
 - 1 chez aucun *Sarotherodon*
 - 5 n'amplifient chez aucun *Tilapia*

Ces résultats se révèlent parfaitement cohérents avec ceux décrits plus haut lors des analyses intra-ségrégation.

β) Comparaison des *BackCross* homologues

L'hypothèse d'homogénéité de ségrégations entre femelle et mâle F1 ainsi qu'entre femelle et mâle F'1 peut être acceptée. Les χ^2 d'homogénéité présentent respectivement des valeurs de probabilité de 0,724 et de 0,084.

γ) Comparaison globale des quatre types de ségrégations hybrides

Le test de χ^2 d'indépendance réalisé simultanément pour les quatre ségrégations hybrides possibles permet de considérer celles-ci comme homogènes au seuil $\alpha = 5\%$ ($P = 0,063$).

4) Déséquilibre de liaison et taux de recombinaison

Les tests de liaison génétique ont été réalisés sur l'ensemble des combinaisons de locus possibles.

L'annexe 9 donne, pour chaque couple de locus pour lequel une liaison a été remarquée pour au moins une ségrégation ou pour lesquels une liaison était attendue d'après Kocher *et al.* (1998), la valeur du taux de recombinaison et du LOD_{max} .

Ainsi 17 déséquilibres de liaison entre locus ont pu être étudiés :

- 11 entre locus appartenant à un même groupe de liaison sur la carte *O. niloticus* femelle (Kocher *et al.*, 1998) ;
- 1 entre locus appartenant à des groupes de liaison différents ;
- 5 entre locus dont l'un est assigné à un groupe de liaison et l'autre à aucun.

L'existence de toutes les liaisons attendues d'après la carte génétique de Kocher *et al.* (1998) a pu être confirmée à l'exception de 2 cas :

- UNH 008 et UNH 103 appartenant au groupe de liaison 17 où aucun déséquilibre n'a été observé ;
- UNH 102 et UNH 138 (du groupe de liaison 16) pour lesquels une seule liaison a été observée mais avec un LOD score de seulement 2,18.

III - Discussion

A – Amplification Interspécifique

La conservation et l'amplification hétérologue de locus microsatellites ont été montrées chez différents groupes animaux comme les oiseaux (Primmer *et al.*, 1996) et les poissons dont les Salmonidés (Presa & Guyomard, 1996, Gharbi, 1997) et les Galaxiidés (Waters *et al.*, 1999).

Toutefois, l'amplification par PCR de fragments d'ADN à partir d'amorces spécifiques de l'espèce de clonage chez des espèces apparentées à celle-ci ne permet pas de conclure à la conservation du locus. Pour cela une confirmation peut être donnée par deux méthodes

- (1) Par hybridation du fragment amplifié avec celui obtenu chez l'espèce de clonage ou avec un oligonucléotide présentant le motif répété attendu.
- (2) Par séquençage direct du fragment amplifié. Cette méthode semble plus robuste car elle n'est pas affectée par la diminution de taille ou l'acquisition d'interruptions dans la séquence microsatellite (Primmer *et al.*, 1996).

En faisant l'hypothèse que les locus amplifiés sont homologues chez les différentes espèces, le taux d'amorçage obtenu sur l'ensemble du panel est assez important (85%). Celui-ci est principalement dû à la conservation du site d'amorçage. La conservation de ces séquences flanquantes permet l'appariement des amorces hétérologues utilisées.

L'absence d'amplification chez les espèces apparentées s'explique beaucoup plus facilement d'un point de vue évolutif par des phénomènes de mutations dans ces régions que par l'absence de locus homologue (Gharbi, 1997). Les modalités de mutations de ces séquences n'intervenant pas dans le choix des amorces, la sélection de nouvelles amorces peut permettre d'augmenter le taux d'amplification si les sites d'amorçage de ces nouvelles amorces ne se trouvent pas modifiés par rapport à la séquence observée chez l'espèce de clonage.

De plus il semble que la position du site d'amorçage par rapport à la séquence répétée influence le taux de *cross priming*. Le choix d'amorces suffisamment éloignées de la région répétée accroît significativement ce taux (Gharbi, *comm. pers.*). Par ailleurs les conditions PCR n'étant pas optimisées pour chaque espèce, les résultats obtenus pour certaines d'entre

elles peuvent montrer un net découplage entre phénotype et génotype. Pour cela, le taux de conservation des sites d'amorçage est sous-estimé.

Le polymorphisme de taille également élevé résulte quant à lui de phénomènes de mutations intervenant principalement au niveau de la séquence répétée. Ceux-ci peuvent être de plusieurs sortes : augmentation ou diminution du nombre de répétition du motif, insertion de nucléotides conduisant à l'interruption de la séquence répétée. De plus Primmer et Ellegren (1998) ont montré une différence de taux de mutations en fonction de la structure du microsatellite (dinucléotide pur, composé ou tétranucléotide). D'autre part des mutations dans les régions flanquantes du microsatellite ont également été mises en évidence comme intervenant dans ce polymorphisme (Angers et Bernatchez, 1996)

Toutefois des phénomènes courants d'homoplasie de taille, mais également de séquence, ont pu être mis en évidence (Estoup, 1995). Ainsi à cause de ces facteurs et du nombre d'individus étudiés, le taux de polymorphisme de taille des locus microsatellites est également sous-estimé.

Les résultats obtenus chez les différents groupes de tilapias semblent refléter leurs relations phylogénétiques : les deux groupes d'incubateurs (*Oreochromis spp.* et *Sarotherodon spp.*) sont en effet plus proches entre eux (respectivement 96% et 94% de locus amplifiés) que du groupe des pondeurs sur substrat (*Tilapia spp.*, avec 82% de locus amplifiés).

Les trois autres espèces de Cichlidés africains étudiées montrent des taux d'amorçage et de polymorphisme de taille inférieurs à ceux observés chez les espèces de Tilapiinés. La divergence importante de ces espèces par rapport aux tilapias et surtout à l'espèce de clonage *O. niloticus* peut être à l'origine de ces résultats.

Ainsi la conservation et le polymorphisme de taille font des marqueurs de type microsatellites des outils privilégiés pour les études de ségrégations pures ou hybrides. Ils peuvent se révéler également intéressant en phylogénie. La séquence des régions flanquantes peut être utilisée pour cela, comme l'ont réalisé Zardoya *et al.* (1996) pour les principaux groupes de Cichlidés, ou bien la séquence répétée. Cette application des microsatellites pose malgré tout un certain nombre de problèmes méthodologique (Goldstein *et al.*, 1995).

B – Etude de la Méiose

1) Ségrégation F1 et maintien de l'état hybride du génome

L'étude de la ségrégation des locus microsatellites au cours de la méiose F1 a permis de montrer une ségrégation mendélienne quasi normale.

Toutes les ségrégations hybrides ont montré que les allèles des deux espèces parentales, amplifiés grâce à une paire d'amorces spécifiques, s'excluent l'un l'autre. Ainsi l'absence de ségrégations non mendélienne entre allèles *O. niloticus* et *S. melanotheron* et la recombinaison observée entre les locus liés chez les espèces pures permettent de supposer l'homologie des locus amplifiés chez les deux espèces et donc une structure caryologique et chromosomique proche entre les deux espèces parentales permettant un appariement correct de chromosomes homologues et la réalisation de *crossing-over*.

De plus le très faible nombre de distorsions de ségrégation observé sur l'ensemble des locus et des géniteurs tendrait à confirmer la transmission mendélienne des allèles des deux espèces parentales à la génération suivante, ce qui entraînerait le maintien au travers de la méiose d'un pool génique hybride stable (50% d'allèles *O. niloticus*, 50% d'allèles *S. melanotheron*).

D'autre part les phénomènes de distorsion décrits par Palti *et al.* (1999) pour les locus UNH-159 et UNH-216 n'ont pu être vérifiés ici. En effet, UNH-159 ne présente aucune distorsion sur l'ensemble des ségrégations étudiées et UNH-216 n'en présente qu'une seule significative. Ainsi l'hypothèse de l'allèle létal lié à ces 2 locus semble peu probable dans notre cas, même si celui-ci peut exister dans la souche utilisée par cet auteur.

Toutefois quelques distorsions ont été observées chez les mâles hybrides réciproques (F1 et F'1). La descendance de chacun d'eux présente un déficit des allèles provenant du grand-père paternel (mâle F1 (N x M), déficit d'allèle M et mâle F'1 (M x N), déficit d'allèle N). Ainsi cette perte a lieu pour les allèles du génome en opposition avec le milieu cytoplasmique de l'hybride F1 (lors de la fécondation). Même si elle est limitée, cette observation est cohérente

avec les cas connus d'élimination sélective de chromosomes chez des hybrides, qui affecte le plus souvent les chromosomes d'origine paternelle (Fujiwara et al., 1997).

Cependant, ceci n'a pu être mis en évidence que de manière globale et limitée ($P = 5\%$), l'écart des locus pris indépendamment étant bien inférieur au seuil de signification. L'existence de ce phénomène devra tout de même être vérifiée et suivie lors des méioses ultérieures (F_2, \dots, F_n) car, bien que marginal, il pourrait engendrer tout au long des générations un déplacement de la structure hybride du pool génique constitué par l'ensemble des individus hybrides.

Par ailleurs, les cas d'amplification de plus de deux allèles par individu ont pu être confirmés lors du génotypage des descendants pour les locus UNH-135 et UNH-197. L'étude de leur génotype a révélé la coségrégation stricte de certains allèles qui confirme l'hypothèse d'écho. Ainsi certains allèles présentent un pattern d'amplification à deux ou trois « bandes » par allèle, ce qui revient à une ou deux copie(s) des sites d'amorçage. Aussi aucun locus microsatellite étudié ici ne présente de duplication. Cependant certains locus n'ayant pu être mis au point correctement, à cause d'un grand nombre de « bandes » amplifiés, comme UNH-111, pourraient présenter une telle duplication comme l'ont proposé Palti *et al.* (1999). Seulement le grand nombre d'allèles en commun chez les deux parents (patterns multi-bandes) ne permet pas d'établir de manière rigoureuse la ségrégation conjointe ou indépendante des différents allèles. Ainsi, bien que cette hypothèse de duplication soit plausible, celle d'amplification aspécifique forte l'est également.

D'autre part les phénomènes de mutation mis en évidence lors de trois ségrégations de la voie femelle (UNH-124 / BC3, $n=1$; UNH-138 / BC9, $n=4$ et UNH-211 / BC5bis, $n=1$) ont montré des taux de mutations très élevés si l'on considère les locus indépendamment les uns des autres (entre 2 et 8%). Seulement sur l'ensemble des locus étudiés, ceux-ci ne s'avèrent plus aussi important. Le séquençage des allèles parentaux nouvellement observés pourrait permettre de comprendre les mécanismes mis en jeu lors de la création de nouveaux allèles.

2) Déséquilibre de liaison

Avec le panel de marqueurs utilisé pour l'étude de la ségrégation hybride, 11 liaisons étaient attendues d'après la carte génétique de *O. niloticus* publiée par Kocher *et al.* (1998) pour la voie femelle. Celles-ci ont toutes pu être vérifiées à l'exception de deux :

- (1) UNH-102 et UNH-138, appartenant au groupe de liaison 16, n'ont montré qu'une seule liaison significative pour un LOD compris entre 2 et 3. Ceci peut s'expliquer par une distance génétique assez grande entre ces deux marqueurs (43,1 cM selon Kocher *et al.* (1998)). L'étude de la liaison avec les autres marqueurs appartenant à ce groupe pourrait confirmer l'existence de cette liaison.
- (2) UNH-008 et UNH-103, deux seuls marqueurs constitutifs du groupe de liaison 17 séparés de 5 cM d'après la carte génétique *O. niloticus*, ne montrent aucun cas de liaison. De plus UNH-008 s'est trouvé lié dans tous les cas de ségrégation testés avec UNH-146 affecté jusqu'ici au groupe de liaison 4. Ceci peut s'expliquer par le fait que ces deux groupes de liaison n'en forment finalement qu'un seul ou bien qu'un ou plusieurs locus de ces groupes y aient été assignés sans qu'ils n'y soient réellement liés. Dans ce cas, soit UNH 008 et UNH 146 sont réellement positionnés sur le groupe de liaison 4, soit sur le 17 ou bien sur un nouveau groupe de liaison indépendant des 2 autres.

Des différences pourraient exister au niveau de la position de certains locus dans le génome de *O. niloticus* entre les différentes souches étudiées. En effet la souche utilisée ici pour l'hybridation est celle de la station de Bouaké (Côte d'Ivoire) qui présente la particularité de résulter d'un mélange entre une souche du Nil et une souche de la Volta. Ceci lui confère un génome bien particulier montrant une grande variabilité (Rognon *et al.*, 1996 et Rognon & Guyomard, 1997), qui peut être dû à des translocations réciproques ayant eu lieu au sein de ces deux populations originales, avant le mélange, ce qui peut avoir modifié les liaisons observées par Kocher *et al.* (1998).

Par ailleurs, la comparaison des déséquilibres de liaison observés a montré des résultats homogènes des ségrégations pures entre voie mâle et femelle *O. niloticus*. Ainsi il semblerait ne pas y avoir de différence de taux de recombinaison entre sexes chez les tilapias, contrairement à ce qui est observé pour les Salmonidés, autre groupe de poissons fortement étudié chez lesquels les mâles recombinent beaucoup moins que les femelles (Johnson *et al.*,

1987) (cette différence de taux de recombinaison entre sexes chez les Salmonidés semble toutefois être une exception chez les poissons).

D'autre part les résultats obtenus à partir de la fratrie pure *S. melanotheron* se montrent fort intéressants. En effet toutes les liaisons attendues d'après la carte *O. niloticus* qui ont pu être testées se sont révélées significatives à l'exception de celle entre UNH-102 et UNH-138 qui n'a pu également être clairement établie pour *O. niloticus*.

Il en va de même concernant les déséquilibres de liaison observés chez les hybrides. De plus les taux de recombinaison obtenus ne semblent pas diverger de ceux observés chez les espèces pures. Aussi dans notre étude nous ne pouvons pas observer de « rétrécissement » de la carte génétique dû à l'état hybride comme nous aurions pu l'attendre.

Ceci permet de confirmer les résultats obtenus précédemment en montrant la proximité de structure des génomes des deux espèces impliquées dans le programme d'hybridation.

Conclusion et perspectives

Cette étude constitue l'une des premières phases du programme d'Hybridation Intergénérique chez les Tilapias mené par le CIRAD. Au cours de celle-ci, nous avons pu mettre au point un panel de marqueurs microsatellites adaptés à l'analyse de ségrégations hybrides, non seulement entre *O. niloticus* et *S. melanotheron* mais également entre d'autres espèces de tilapias, comme *O. mossambicus*.

En effet les tests d'amorçage interspécifique ont montré, sous réserve d'homologie, une forte conservation de locus sur l'ensemble des espèces de tilapias testées et au-delà pour les autres espèces de Cichlidés africains, ce qui permet leur utilisation lors de l'étude concernant d'autres espèces.

Cette étude de la conservation de l'amplification et du polymorphisme des locus microsatellites pourrait être poursuivie dans plusieurs voies :

Tout d'abord, le panel d'espèces pourrait être augmenté par des espèces appartenant aux groupes de Tilapiinés non encore échantillonnés, ainsi que par des espèces plus éloignées appartenant aux autres grands groupes de Cichlidés africains (Haplochrominiens, Lamprologiens,...) (Streelman *et al.*, 1998) ou néotropicaux (Cichlasomines,...). Ceci nécessiterait un travail d'ajustement important des conditions d'amorçage hétérologue afin d'obtenir des taux d'amplification qui ne soient pas trop sous-estimés.

D'autre part, le séquençage des allèles amplifiés chez les différentes espèces permettrait de confirmer (ou non) de manière non-équivoque leur homologie. Ceci permettrait de plus, l'étude de leurs modes de mutation et l'analyse de l'évolution de leur structure aussi bien au niveau des régions répétées que des régions flanquantes.

Ainsi malgré les problèmes méthodologiques rencontrés actuellement, ces marqueurs microsatellites pourraient permettre une étude phylogénétique de ces groupes de Cichlidés. Notamment ceci pourrait permettre de tester la monophylie des genres *Oreochromis* et *Sarotherodon*, hypothèse émise par Trewavas (1983) et controversée par Peters et Berns (1982), selon lesquels plusieurs lignées d'incubateurs buccaux seraient apparues à différentes époques à partir d'ancêtres pondeurs sur substrat ; les incubateurs buccaux ne devraient donc pas être séparés en *Oreochromis spp.* et *Sarotherodon spp.* mais en incubateurs « anciens » et « récents » classés dans le genre *Tilapia*.

D'autre part l'étude des ségrégations hybrides a permis de caractériser la méiose F1 pour les deux sens de croisement originaux (F1 et F'1) et pour chaque sexe. Celle-ci a pu être comparée avec la méiose pure des deux espèces parentales. De plus les déséquilibres de liaison observés ont pu être confrontés avec ceux établis par Kocher *et al.* (1998), montrant la conservation des groupes de liaison, l'affectation de trois nouveaux locus à des groupes préexistant mais également deux ruptures de liaison. Ceci laisse supposer une certaine variabilité structurale du génome des populations *O. niloticus* mais surtout la possibilité de développer un programme de cartographie comparée *O. niloticus* / *S. melanotheron*.

Les ségrégations observées ici ont montré une ségrégation mendélienne proche de la normale et une recombinaison des caractères intéressants des espèces parentales, qu'il conviendra bien sûr de réaliser et de stabiliser. Toutefois de faibles déséquilibres ont pu être mis en évidence dans la descendance des mâles hybrides montrant une perte d'allèles du grand-père. L'étude de réplicats et la suivie des descendance ultérieures (F3,..., Fn) permettraient d'éclaircir ce point.

Aussi cet hybride entre *O. niloticus* et *S. melanotheron* représente un modèle théorique intéressant pour l'étude de l'évolution des génomes au cours de phases d'hybridation. Celle-ci pourrait être également complétée par des aspects morphologique et caryologique (Hybridation Génomique In Situ – GISH) afin d'étudier les implications des phénomènes d'hybridation aux différents niveaux d'intégration de l'organisme.

Références Bibliographiques

- Angers B., & Bernatchez L.,** 1996. Usefulness of heterologous microsatellites obtained from brook char, *Salvelinus fontinalis* Mitchill, in other *Salvelinus* species. *Molecular Ecology*, **5** : 317-319.
- Blanc J. M. & Chevassus B.,** 1986. Survival, growth and sexual maturation of the tiger trout hybrid (*Salmo trutta* ♀ x *Salvelinus fontinalis* ♂). *Aquaculture*, **52** : 59-69.
- Brummett R. E., Halstrom M. L., Dunham R. A. & Smitherman R. O.,** 1988. Development of biochemical dichotomous keys for identification of American populations of *Oreochromis aureus*, *O. mossambicus*, *O. niloticus*, *O. urolepis hornorum* and red tilapia, p135-141. In Pullin R.S.V., Bhukasawan T., Tonguthai K. & Maclean J.L. (eds.) *The Second International Symposium on Tilapia in Aquaculture*. ICLARM Conference Proceedinds 15, 823 pp.
- Chevassus B.,** 1998. Modification du phénotype sexuel et du mode de reproduction chez les poissons Salmonidés: inversion sexuelle hormonale, gynogénèse, hybridation interspécifique et polyploïdisation. Thèse de Doctorat de l'Université Paris-Sud, Orsay, 162 pp.
- Danzmann R.,** 1999. LINKMFEX : Linkage analysis program for outcrossed families with male or female exchange. *Journal of heredity*, Soumis.
- Dugue D. & Delaporte P.,** 1973. Tables Statistiques. *Revue de statistique appliquée*, N° spécial, 100 pp.
- Estoup A.,** 1995. Apport des marqueurs microsatellites pour l'étude de la variabilité génétique chez deux insectes sociaux, l'abeille domestique (*Apis mellifera* L.) et le bourdon (*Bombus terrestris* Latreille) : de la colonie à l'espèce. Thèse de doctorat de l'Université de Paris Sud, Orsay.
- Estoup A. & Angers B.,** 1998. Microsatellites and Minisatellites for Molecular Ecology : Theoretical and Empirical Considerations. In *Advances in Molecular Ecology*, G.R. Carvalho (Ed.), IOS Press.
- Estoup A. & Martin O.,** 1996. Marqueurs microsatellites : isolement à l'aide de sonde non radioactive, caractérisation et mise au point. 76 p. – Disponible sur le site Internet : <http://www.inapg.inra.fr/dsa/microsat/microsat.htm>.
- Fryer G. & Iles T. D.,** 1972. The cichlid fishes of the great lakes of Africa. Tropical Fish Hobbyist Publication, Neptune City, New Jersey, 491 pp.

- Fujiwara A., Abe S., Yamaha E., Yamazaki F. & Yoshida M. C., 1997.** Uniparental chromosome elimination in the early embryogenesis of the inviable salmonid hybrids between masu salmon female and rainbow trout male. *Chromosoma* **106** :44-52.
- Gharbi K., 1997.** Conservation des locus microsatellites chez les Salmonidés : Application à la cartographie comparée. Mémoire de Diplôme d'Ingénieur Agronome, Institut National Agronomique Paris-Grignon.
- Goldstein D. B. et al., 1995.** An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics* **139** : 463-471.
- Hubbs C. L. & Hubbs L. C., 1932.** Apparent parthogenesis in nature, in form of fish of hybrid origin. *Science*, **76** : 628-630.
- Hulata G., Wohlfarth G. & Rothbard S., 1983.** Progeny testing selection of tilapia brood stocks producing all-male hybrid progenies – preliminary results. *Aquaculture*, **33** : 263-268.
- Johnson K. R., Wright J. E. & May B., 1987.** Linkage relationships reflecting ancestral tetraploidy in Salmonid fish. *Genetics* **116** : 579-591.
- Kocher T. D. , Lee W. J., Sobolewska H., Penman D. & McAndrew B., 1998.** A genetic linkage map of a cichlid fish, the Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Genetics* **148** : 1225-1232.
- Kosambi D. D., 1944.** The estimation of map distance from recombination values, *Ann. Eug.*, **12** : 172-175.
- Lee W. J. & Kocher T. D., 1996.** Microsatellite DNA markers for genetic mapping in *Oreochromis niloticus*. *J. fish biol.* **49** : 169-171.
- Lorieux M., 1994.** Aspects statistiques de la cartographie des marqueurs moléculaires, document de travail de la mission biométrie n°1-94, Centre de coopération international en recherche agronomique pour le développement, 49 pp.
- Miller R. M. & Schultz R. J., 1959.** All-female strains of the teleost fishes of the genus *Poeciliopsis*. *Science* **130** : 1656-1657.
- Nelson J. S., 1984.** Fishes of the world - 2nd edition. Wiley-Interscience Publication, 523 pp.
- Ott J., 1985.** Analysis of human genetic linkage. MD John Hopkins Press, Baltimore, 232 pp.
- Palti Y. et al., 1999.** Sex linkage and non-mendelian segregation of microsatellite DNA markers in a meigenetic family and domestic strains of tilapia (*Oreochromis aureus* and *O. niloticus*).in Plant & Animal Genome VII Conference, San Diego, January 17-21, 1999.
- Peters & Berns, 1982.** Die Maulbrutpflege der Cichliden untersuchungen zur Evolution eines Verhaltensmusters. *Z. zool. Syst. Evolu. –forsch.*, **20** : 18-52.

- Presa P. & Guyomard R.**, 1996. Conservation of microsatellites in three species of salmonids. *J. fish biol.* **49** : 1326-1329.
- Primmer C. R., Møller A. P. & Ellegren H.**, 1996. A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Mol. Ecol.* **5** :365-378.
- Primmer C. R. & Ellegren H.**, 1998. Patterns of molecular evolution in avian microsatellites. *Mol. Biol. Evol.* **15**(8) : 997-1008.
- Rice W. R.**, 1989. Analysing tables of statistical tests. *Evolution* **43**(1) :223-225.
- Rognon X. & Guyomard R.**, 1997. Mitochondrial DNA differentiation among East and West African Nile Tilapia populations. *Brief Communications, J. fish biol.* **51** : 204-207.
- Rognon X., Andriamanga M., McAndrew B. & Guyomard R.**, 1996. Allozyme variation in natural and cultured populations in two species : *Oreochromis niloticus* and *Tilapia zillii*. *Heredity*, **76** : 640-650.
- Schultz R. J.**, 1969. Hybridization, unisexuality and polyploidy in the teleost *Poeciliopsis* (Poeciliidae). *Am. Nat.*, **103** : 605-619.
- Schultz R. J.**, 1980. Role of polyploidy in the evolution of fishes. In *Polyplody : biological relevance*. Lewis W. H. ed. : 313-340. Plenum Press, New York.
- Streelman J. T., Zardoya R., Meyer A. & Karl S. A.**, 1998. Multilocus phylogeny of cichlid fishes (Pisces : Perciformes) .Evolutionary comparison of microsatellite and single-copy nuclear loci. *Mol. Biol. Evol.* **17**(7) : 798-808.
- Teugels G. G. & Thys van den Audenaerde D. F. E.**, 1992. *Tilapia*. In *Checklist of the freshwater fishes of Africa, CLOFFA IV*. J. Daget, J. P. Gosse, G. G. Teugels & D. F. E. Thys van den Audenaerde (eds), MRAC (Tervuren) et ORSTOM (Paris), p 482-508.
- Thys van den Audenaerde D. F. E.**, 1969. An annotated bibliography of *Tilapia* (Pisces, Cichlidae). *Doc. Zool.*, MRAC, Tervuren, 450 pp.
- Toguyeni A., Fauconneau B., Melard C., Faustier A., Lazard J., Baras E., Kühn E. R., Van der Geyten S., Baroiller J. F.**, 1997. Sexual dimorphism studies in tilapias using two pure species *O. niloticus* and *S. melanotheron*, and their intergeneric hybrids (*O. niloticus* x *S. melanotheron* & *S. melanotheron* x *O. niloticus*). In *Proceeding of 4th International Symposium on Tilapias in Aquaculture*, Orlando Florida, 9-12 Nov. 1997. Ed. K. Fitzsimmons. NRAES-106.
- Trewavas E.**, 1982. Tilapias : taxonomy and speciation. In *The biology and culture of tilapias*. R. S. V. Pullin & R. H. Lowe-McConnell (eds), ICLARM Conference Proceedings 7, International Center of Aquatic Living Ressources Management, Manila, Philippines, p 3-13.

- Trewavas E.**, 1983. Tilapiine fishes of the genera *Sarotherodon*, *Oreochromis* and *Danakilia*. British Museum (Natural History), London, 583 pp.
- Trewavas E. & Teugels G. G.**, 1992a. *Oreochromis*. In Checklist of the freshwater fishes of Africa, CLOFFA IV, J. Daget, J. P. Gosse, G. G. Teugels & D. F. E. Thys van den Audenaerde (eds), MRAC (Tervuren) et ORSTOM (Paris), p 307-346.
- Trewavas E. & Teugels G. G.**, 1992b. *Sarotherodon*. In Checklist of the freshwater fishes of Africa, CLOFFA IV, J. Daget, J. P. Gosse, G. G. Teugels & D. F. E. Thys van den Audenaerde (eds), MRAC (Tervuren) et ORSTOM (Paris), p 425-437
- Waters J. M., Esa Y. B. & Wallis G. P.**, 1999. Characterization of microsatellite loci from a New Zealand freshwater fish (*Galaxias vulgaris*) and their potential for analysis of hybridization in Galaxiidae. *Mol. Ecol.* **8** : 1075-1092.
- Weir B. S.**, 1990. Genetic Data Analysis. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 377 pp.
- Zardoya R., Vollmer D. M., Craddock C., Streelman J. T., Karl S. & Meyer A.**, 1996. Evolutionary conservation of microsatellite flanking regions and their use in resolving the phylogeny of cichlid fishes (Pisces : Perciformes). *Proc. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* **263** : 1589-1598.

ANNEXES :

Annexe 1 : Liste de l'ensemble des locus microsatellites utilisés : le groupe de liaison, le motif, la structure et la taille sont observés chez *O. niloticus* (d'après Kocher *et al.* , 1998) ; en italique les locus exclus lors de la mise au point, en caractères droits les locus utilisés pour les tests d'amorçage interspécifique et en gras ceux utilisés également pour l'étude de la ségrégation hybride.

Locus	groupe de liaison	Motif microsatellite	structure	Taille (pb)	Conditions PCR	Séquences des amorces (5' -3')	N° Accession GENBANK
UNH-008	17	[AAC] _n	pure	222	R* 58/1,2/30	F AGC GCC ACT CTT TGT CC R GCG GGT GAT CTG CTG TC	G31346
UNH-102	16	[CA] _n	pure	145	R* 50/1,2/30	F AAA TGA TAC ATG ACT GCT TA R TTA GGA CTT ATC TGT CTA CAA GC	G12255
UNH-103	17	[CA] _n	pure	193	R* 48/1,5/30	F CAA TGT CCA TCC TTC CT R CTG TCT GAC TGC AAA TGT AA	G12256
UNH-105		[CA] _n	pure	129	R* 60/1,2/30	F ACA CAT CAC GAT AAA ATA TCA TA R CAT ATA ATA CAC AGG TTA CAT GC	G12258
UNH-106	14	[CT] _n -[CA] _n	composé	134	R* 50/1,2/30	F CCT TCA GCA TCC GTA TAT R GTC TCT TTC TCT CTG TCA CAA G	G12259
UNH-109		[CA] _n -[CT] _n -[CA] _n -[CT] _n -[AT]	composé	177	R* 60/1/30	F GAT ATC GAT TTT CCC GT R CAT AAT ACT CCA TCA CTT TTA CC	G12262
UNH-111	7	[CA] _n	pure	192	F* 58/1,2/30	F TGC TGT TCT TAT TTT CGC R ATA AGA GTG TAT GCA TTA CTG G	G12264
UNH-115	3	[CA] _n -[CG] _n -[CA] _n	composé	149	F* 50/1,5/30	F ACC TTC ATC TCG GTC AG R TCA AGC AGC TGA TTT TT	G12268
UNH-117		[CA] _n	interrompu	118	R* 52/1,2/30	F TGA AAT GCA TGA TCA AA R AGA CAG GAG AGT ATT TAA GTT TG	G12270
UNH-120	18	[CA] _n -[TA] _n -[CA] _n	composé	160	R* 48/2/30	F TAA GGC TCT ATG TGG TC R TTA AAG GGG AAG AAA GA	G12273
UNH-123	12	[CA] _n	pure	197	F* 48/1,2/30	F CAT CAT CAC AGA CAG ATT AGA R GAT TGA GAT TTC ATT CAA G	G12276
UNH-124		[GT] _n	pure	160	F* 56/1,2/30	F AAT TTG GCA GCT TCT TTT R CCC ACA AGC ATA GTA AAC T	G12277
UNH-125	16	[CA] _n -[TA] _n	composé	156	R* 48/1,5/30	F GCT ATC TAC CTA CCT ACC TGT R TCA TTC TTT CAC AAA TGT TTC TA	G12278
UNH-129	8	[CA] _n	interrompu	193	R* 52/1,2/30	F AGA AGT CGT GCA TCT CTC R TGT ACA TCA TCT GTG GG	G12282

Annexe 1 : Liste de l'ensemble des locus microsatellites utilisés : le groupe de liaison, le motif, la structure et la taille sont observés chez *O. niloticus* (d'après Kocher *et al.* , 1998) ; en italique les locus exclus lors de la mise au point, en caractères droits les locus utilisés pour les tests d'amorçage interspécifique et en gras ceux utilisés également pour l'étude de la ségrégation hybride.

Locus	groupe de liaison	Motif microsatellite	structure	Taille (pb)	Conditions PCR	Séquences des amorces (5' -3')	N° Accession GENBANK
UNH-130	23	[CA] _n	pure	191	R* 50/1,2/30	F AGG AAG AAT AGC ATG TAG CAA GTA R GTG TGA TAA ATA AAG AGG CAG AAA	G12283
UNH-131	3	[CA] _n	pure	194	F* 48/2/30	F CAG AAT CAA CTT TTG GA R GTG ATT TTT AAA TAG ACC TTC ACT A	G12284
UNH-132	9	[GA] _n	pure	113	R* 54/1,2/30	F ATA TAA GAA ACT GAG TCG GTG AG R TGG AAA TAG AGG GTG GGT GAG	G12285
UNH-135	3	[CA] _n	interrompu	157	R* 50/1,5/30	F TAT GTG TGT GAA GGC TTT T R CTC TGA CTA TAT GTC TAT AGC TGG	G12287
UNH-138	16	[CA] _n	pure	196	R* 48/1,5/30	F TTC AGC TTC ATC TCT TG R CCA TTT TAA CCT CTC CAT CT	G12290
UNH-142		[CA] _n	interrompu	170	F* 48/1,2/30	F CTT TAC GTT GACGCA GT R GTG ACA TGC AGC AGA TA	G12294
UNH-146	4	[CA] _n	interrompu	122	F* 60/1/30	F CCA CTC TGC CTG CCC TCT AT R AGC TGC GTC AAA CTC TCA AAA G	G12298
UNH-149	5	[CA] _n	pure	156	R* 48/1,5/30	F TTA AAA CCA GGC CTA CC R GTT CTG AGC TCA TGC AT	G12301
UNH-154	6	[CA] _n	pure	124	R* 50/1,2/30	F ACG GAA ACA GAA GTT ACT T R TTC CTA CTT GTC CAC CT	G12306
UNH-159	2	[CA] _n	pure	238	R* 56/1,2/30	F TTG TTT TAG GAG CTT CTT TTG TC R ATA TTC ATC TGG ATT TGG CTC TAA	G12311
UNH-162	19	[CA] _n	pure	195	R* 48/1,5/30	F CAG ACA CAG CAG AGG AT R TGA TAA GTA ATT CAT CTG TTT G	G12314
UNH-169	10	[GT] _n	interrompu	139	R* 54/1,2/30	F GCT CAT TCA TAT GTA AAG GA R TAT TTT TTG GGA AGC TGA	G12321
UNH-172	4	[CA] _n	pure	180	R* 48/1,2/30	F AAT GCC TTT AAA TGC CTT CA R CTT TTA TAG TCG CCC TTT GTT A	G12324
UNH-173	13	[CA] _n	pure	174	F* 55/1,2/30	F CGT GAG AAA ACA ATG GT R TAT TGA TTT TAT AGC TGT CTG G	G12325

Annexe 1 : Liste de l'ensemble des locus microsatellites utilisés : le groupe de liaison, le motif, la structure et la taille sont observés chez *O. niloticus* (d'après Kocher *et al.* , 1998) ; en italique les locus exclus lors de la mise au point, en caractères droits les locus utilisés pour les tests d'amorçage interspécifique et en gras ceux utilisés également pour l'étude de la ségrégation hybride.

Locus	groupe de liaison	Motif microsatellite	structure	Taille (pb)	Conditions PCR	Séquences des amorces (5' -3')	N° Accession GENBANK
UNH-174	20	[CA] _n	pure	170	F* 48/1,5/30	F TGA AAA ATG GAA TTT GG R TTA GAT GAG ATA TGA AAC TGC	G12326
UNH-186	15	<i>[TA]_n-[CA]_n-[TA]_n</i>	<i>composé</i>	178	<i>R* 50/1,5/30</i>	<i>F TCC ATC TAT ATG TAT ATG TCA TGT A</i> <i>R CAC CAA AGT ATC GAA CC</i>	G12338
UNH-189	12	[CA] _n	pure	187	<i>R* 52/1,2/30</i>	F ATC GAT GCT TTA AGA ATC AG R TTC TCT GAC ATT TTT CAG C	G12341
UNH-190	21	[CT] _n -[CA] _n	composé	167	R* 60/1/30	F CGC GAT CGA GCA TTC TAA R TGT CTG CAC GCG CTT TTG T	G12342
UNH-192	11	[CA] _n	pure	139	R* 48/2/30	F GGA AAT CCA TAA GAT CAG TTA R CTT TTT CAG GAT TTA CTG CTA AG	G12344
UNH-193	1	[CA] _n	pure		R* 52/1,5/30	F CAG AGT TCT CAG AGA CAG A R CCT CCT CTT AGT GTT CAT GTA G	G12386
UNH-194	22	<i>[CA]_n</i>	<i>pure</i>	195	<i>R* 60/1/30</i>	<i>F ACT TAA TTT TTC AG CAT GAC A</i> <i>R ACA CAG CCT GAA CTC TG</i>	G12345
UNH-197	23	[CA] _n	interrompu	191	R* 50/1,2/30	F CAG GAT GGT GAG ATG TTT R TTA AGT GGA AGA AGT CAA TG	G12348
UNH-201	4	<i>[CA]_n</i>	<i>pure</i>	198	<i>R* 64/1/30</i>	<i>F CTG CTA GAC TGC GAA AC</i> <i>R ACA GTG CAA CAC CAG AC</i>	G12352
UNH-207		[CA] _n	interrompu	138	R* 60/1,2/30	F ACA CAA CAA GCA GAT GGA GAC R CAG GTG TGC AAG CAG AAG C	G12358
UNH-211	30	[CA] _n	pure	112	R* 50/1,2/30	F GGG AGG TGC TAG TCA TA R CAA GGA AAA CAA TGG TGA TA	G12362
UNH-216	23	[CA] _n	pure	124	R* 54/1,2/30	F GGG AAA CTA AAG CTG AAA TA R TGC AAG GAA TAT CAG CA	G12367
UNH-223	3	<i>[CA]_n</i>	<i>pure</i>	189	<i>R* 60/0,8/30</i>	<i>F ACC TGC TAG ATA AGA GCT TAA T</i> <i>R TGC CCT GGT CTT TAT TTA</i>	G12374

Annexe 2 : Liste et généalogie des familles analysées ; type de croisement : N=*O. niloticus* , M=*S. melanotheron* , F1=(*O. niloticus* x *S. melanotheron*), F'1=(*S. melanotheron* x *O. niloticus*) ; géniteurs : code d'identification et/ou lot, Nilo=*O. niloticus* , Melano=*S. melanotheron* , Hyb=hybride ; les individus non-typés sont indiqués en grisé.

Familles	Type de croisement	Géniteurs						date fécondation	n (analysé)	état
		Mère	Père	Grand-mère maternelle	Grand-père maternel	Grand-mère paternelle	Grand-père paternel			
BC2	Back Cross (F1 x N)	Hyb F1 1F1E0D5462	Nilo 1F28115850	Nilo 1F1E1A5F4A	Melano non disponible	Nilo "x"(C1-27) 1F1D32266C	Nilo 7F7D30124D	12/07/1998	50	poissons congelés
BC3	Back Cross (N x F1)	Nilo (lot A1-27) 1F1D403B49	Hyb F1 (L1) 40574F7611	Nilo (A) 7F7D2F3A79 (non trouvé)	Nilo (A) 1F1E252777 (non trouvé)	Nilo 1F1E1A5F4A	inconnu	11/01/1999	50	alevins en alcool
BC5bis	Back Cross (F'1 x N)	Hyb F'1 (L1) 07319	Nilo (Lot4) 03446	Melano 22193F1758	Nilo (B1-27) 1F1D4E1264 1F28042114 1F2819514F	Nilo "x"(C1-27) 1F1D32266C	Nilo "y"(B1-27) 1F1D4E1264	10/03/1999	50	alevins en alcool
BC9	Back Cross (N x F'1)	Nilo (A1-27) 1F1E0C1720	Hyb F'1 (L2) 05356	Nilo 7F7D2F3A79 (non retrouvé)	Nilo 1F1E252777 (non retrouvé)	inconnu	inconnu	08/03/1999	50	alevins en alcool
L4-Melano	Fratrie pure (M x M)	Melano "w" 1F1D2D286F	Melano "z" 1F1D4E175F	inconnu	inconnu	inconnu	inconnu	01/04/1998	50	poissons congelés + nageoire en alcool

RECOMMANDATIONS

Le clonage nécessite l'obtention d'un ADN de bonne qualité (propre et pas trop dégradé) et en quantité suffisante (4 à 5 μg au minimum). Il est donc nécessaire de faire plusieurs lavages au phénol et de partir d'une quantité de matériel relativement importante conservée dans de bonnes conditions (matériel frais, congelé ou conservé dans de l'éthanol pur depuis quelques jours).

Afin de faciliter l'extraction, ne pas mettre trop de matériel par tube: il est conseillé de faire plusieurs tubes d'extraction par espèce avec une quantité limitée de matériel par tube pour obtenir la quantité finale d'ADN désirée.

PROTOCOLE

Deux types de tampon d'extraction possibles:

Tampon d'extraction TNES-Urée: Tris-HCl 10 mM pH 8, NaCl 0,3 M, SDS 1 %, EDTA 10 mM, Urée 4 M

ou

Tampon d'extraction « Wilson »: Tris-HCl 100mM pH 8, EDTA 10mM pH 8, NaCl 100mM, SDS 0,1 %, β -mercaptoéthanol 50mM

• Traitement du matériel:

Broyage en glace du matériel dans

500 μl de Tampon d'extraction + 20 μl de protéinase K (10 mg/ml)

(Prévoir un ajustement des volumes en fonction du nombre de phénols afin d'avoir un volume final de surnageant raisonnable: 150/200 μl)



Incubation en étuve 2 (idéalement une nuit) heures à 55°C avec agitation

(ou bain-marie avec vortexage toutes les demi-heures)



Centrifugation 2 minutes à 10 000 g afin d'éliminer les gros fragments



Récupération de 400 μ l de surnageant

Nettoyage au phénol

Ajouter 1 V de phénol + Agitation manuelle
forte (5 minutes)



Centrifugation 15 minutes à 10 000 g



Récupération de 250 μ l de surnageant
Ne pas prélever près de l'interface !

⇒ **Série d'opérations à répéter si des
impuretés persistent au niveau de l'interface
et/ou dans la phase aqueuse
(phase supérieure)**

• Précipitation

Ajouter 2 à 2,5 V d'éthanol pur stocké à -20°C + 1/10 V d'acétate de Sodium 3 M

+ Vorter

[On observe généralement la formation d'une « méduse » d'ADN]



Centrifugation 20 minutes à 10 000 g



Vider délicatement l'éthanol + Ajouter 800 µl d'éthanol 70% stocké à -20°C

Ne pas vortexer afin de ne pas décrocher le culot !



Centrifugation 12 minutes à 10 000 g



Vider délicatement l'éthanol 70%, sécher le culot sous vide et si possible à chaud

(Utilisation d'un kleenex pour éliminer les gouttes d'éthanol et d'un speedvac pour le séchage)



Reprise du culot dans 100 à 200 µl d'H₂O

(Pour une utilisation en PCR -excepté séquençage-, il est préférable de reprendre le culot dans du TE)

(Laisser l'ADN se reprendre à température ambiante. Pour accélérer ce processus on peut éventuellement mettre en bain-marie à 37°C en vortexant toutes les 5 minutes). Stocker à -20°C.

Annexe 4 : protocole de séquençage M13PU (fmol DNA Sequencing System).

I.Marquage du primer

Préparation pour 3 réactions de séquence (volume final par séquence: 10µl) .
Dans un tube PCR (200µl),

• Primer M13PU (10µM)	0.5µl
• γP ³³	2.5µl
• T4 Polynucleotide Kinase 10X buffer	0.5µl
• T4 Polynucleotide Kinase (5u/µl)	0.5µl
• H ₂ O	1µl
Total	5µl

Incuber 30minutes à 37°C

II.Réaction de séquence

1) Dans 4 tubes PCR notés G, A, T et C, ajouter 2µl du d/ddNTP correspondant. Conserver ces tubes à 4°C (glace).

2) Mix de réaction :
Dans un tube PCR,

• DNA control (pGEM –3Zf(+)) à 200µg/ml	1µl
• fmol Sequencing 5X buffer	5µl
• M13PU marqué	1.5µl
• H ₂ O	8.5µl
Total	16µl

3) Dans mix de réaction, ajouter 1µl de Taq DNA Polymerase (5u/µl), homogénéiser.

4) Ajouter 4µl de mix de réaction dans chacun des 4 tubes PCR contenant les d/ddNTP, placer les tubes dans thermo-cycleur.

5) Programme PCR :

• 95°C – 2 minutes	
• 95°C – 30 secondes	
42°C – 30 secondes	
70°C – 1 minute	X 30 Cycles
• 4°C – infini.	

6) Ajouter 4µl de bleu par tube et dénaturer 4 minutes à 95°C avant dépôt.

Annexe 5 : Résultats des tests d'amplification interspécifique pour 34 locus microsatellites clonés chez *O. niloticus* et 15 autres espèces : conditions PCR utilisées, intensité et qualité d'amplification (++ = très bonne, + = assez bonne, - = moyenne, -- = médiocre et ? = absence d'amplification), variabilité (F = fixé, H = polymorphe, dupliq = locus pouvant être dupliqué, écho = locus pouvant présenter des bandes écho, nul = présence probable d'allèles nuls), nombre allèles différents amplifiés et nombre d'individus testés.

Populations			<i>O. niloticus</i> Bouaké	<i>O. mossambicus</i> Mozambique	<i>O. aureus</i> Lac Manzalla	<i>O. shiratus</i> Malawi	<i>O. urospora</i> homoionum Bouaké	<i>O. saka</i> Malawi	<i>O. squamipinnis</i> Malawi	<i>O. macrochir</i> mweruensis Bouaké	<i>S. melanothron</i> Lag. Ebrié	<i>S. galilaeus</i> Niger (Djk)	<i>T. zillii</i>	<i>T. zillii</i> Nil	<i>T. zillii</i> Sassandra	<i>T. dageti</i> Niger (Djk)	<i>T. guineensis</i>	<i>T. guineensis</i> Sénégal	<i>T. guineensis</i> Lag. Ebrié	<i>H. bimaculatus</i> Côte d'Ivoire	<i>C. guntheri</i> Niger	<i>H. sp.</i> "rockyberensis" Bassin du Victoria HRK-ag
Locus	PCR-IT	code	ON-bk	OMO-st	OA-st	OSH-mw	OUH-bk	OSA-mw	OSQ-mw	OMA-bk	SMM-eb	SGG-nb	TZ	TZ-st	TZ-sas	TD-ng	TG	TG-sg	TG-eb	HB-co	CG-nb	
UNH-008	R	intensité	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	56/1,2/30	variabilité	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	F	F	F	F	F	F	F	H	H	F
	6000	n(allèles)	4	2	2	4	2	6	7	2	2	6	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1
UNH-102	R	intensité	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++/-									++	++
	48/1,2/30	variabilité	H	H		H		H	H	H	H	H									F	F
	4500	n(allèles)	3	2		7		7	7	2	4	2									1	1
UNH-103	R	intensité	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+										
	46/1,5/30	variabilité	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H (nul)										F
	6000	n(allèles)	3	3	2	5	2	10	10	4	4	5									2	1
UNH-106	R	intensité	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	?	?	?	++	++
	48/1,5/30	variabilité	H	H	H	H		H	H	F	H (nul)	H (nul)	F	F		F (ou H nul)	H	0	+	+	H	H
	3500	n(allèles)	4	2	3	6		4	5	1	3	4	1	1		1	4	2	4	2	4	3
UNH-115	F	intensité	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	++	++	?
	48/1,5/30	variabilité	H	H	F	H	F	H	H	F	F	H	H	F	H	H	H	H	F	H (duplic.)	F	
	3500	n(allèles)	3	3	1	4	1	8	3	1	1	5	2	1	2	2	2	2	1	7	1	
UNH-117	R	intensité	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	52/1,2/30	variabilité	F	F	F	F		H	F	F	H	H	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
	4500	n(allèles)	1	1	1	1		2	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
UNH-120	R	intensité	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	H (dupliq.)
	46/2/30	variabilité	H (dupliq.)	H (dupliq.)	H (dupliq.)	H (dupliq.)	H (dupliq.)	H (dupliq.)	H (dupliq.)	H (dupliq.)	H (dupliq.)	H (dupliq.)	F (dupliq.)	F (dupliq.)	F (dupliq.)	F (dupliq.)	F (dupliq.)	F (dupliq.)	F (dupliq.)	F (dupliq.)		2
	4500	n(allèles)	5	2	3	8	2	11	8	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1		2
UNH-123	F	intensité	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	?	?	?	++	++	++	++	++	++	++
	48/1,2/30	variabilité	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H				H	F	F	F	F	F	F
	4500	n(allèles)	6	3	3	3	3	4	6	2	3	5				2	1	1	1	1	1	1
UNH-124	F	intensité	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++ / ?	?	++	?	?	?	?	?	?	?
	50/1,2/30	variabilité	H	H	H	F		F	H	F	F	H	H		H							
	7500	n(allèles)	4	2	4	1		1	2	1	1	6	2		2							
UNH-125	R	intensité	++	?	++	++	?	?	?	+	++	+	++	++	++	++	++	++	++	?	?	++
	46/2/30	variabilité	H		F	H				H	H	H (nul)	F	F	F	H	H	F	F		F	F
	4500	n(allèles)	4		1	3				2	4	3	1	1	1	3	2	1	1		1	1
UNH-129	R	intensité	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+
	46/1,5/30	variabilité	H	H	H	H	H	H	H	F	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	F	H
	4500	n(allèles)	6	2	2	4	2	6	6	1	4	5	3	3	2	2	2	2	2	2	1	2
UNH-130	R	intensité	++	++ ou -	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	?	?	++
	48/1,2/30	variabilité	H	H	H	H		H (duplic.)	H (duplic.)	H	H (nul)	H	F	F	F	H	H	F	F			H
	4500	n(allèles)	8	2	2	5		5	5	2	3	5	1	1	1	2	2	1	1			2

Annexe 5 : Résultats des tests d'amplification interspécifique pour 34 locus microsatellites clonés chez *O. niloticus* et 15 autres espèces : conditions PCR utilisées, intensité et qualité d'amplification (++) = très bonne, + = assez bonne, - = moyenne, -- = médiocre et ? = absence d'amplification), variabilité (F = fixé, H = polymorphe, dupliq = locus pouvant être dupliqué, écho = locus pouvant présenter des bandes écho, nul = présence probable d'allèles nuls), nombre allèles différents amplifiés et nombre d'individus testés.

Populations			<i>O. niloticus</i> Bouaké	<i>O. mossambicus</i> Mozambique	<i>O. aureus</i> Lac Manzalla	<i>O. shiratus</i> Malawi	<i>O. urolepis</i> hormorum Bouaké	<i>O. saka</i> Malawi	<i>O. squamipinnis</i> Malawi	<i>O. macrochir</i> mweruensis Bouaké	<i>S. melanothron</i> Lag. Ebrié	<i>S. galilaeus</i> Niger (Djk)	<i>T. zillii</i>	<i>T. zillii</i> Nil	<i>T. zillii</i> Sassandra	<i>T. dageti</i> Niger (Djk)	<i>T. guineensis</i>	<i>T. guineensis</i> Sénégal	<i>T. guineensis</i> Lag. Ebrié	<i>H. bimaculatus</i> Côte d'Ivoire	<i>C. guntheri</i> Niger	<i>H. sp.</i> "rockdribensis" Bassin du Victoria HRK-sq
Locus	PCR-HIT	code	ON-bk	OMO-st	OA-st	OSH-mw	OUH-bk	OSA-mw	OSQ-mw	OMA-bk	SMM-eb	SGG-nb	TZ	TZ-st	TZ-sas	TD-ng	TG	TG-sg	TG-eb	HB-co	CG-nb	HRK-sq
UNH-131	F 48/2/30 6500	intensité variabilité n(allèles) réplicats	+	H	-	H	-	F	H	H	+	H	?	?	?	?				?	?	
			16	2	2	2	2	2	2	2	6	2	2	2	2	2				2	2	
UNH-132	R 50/1,2/30 3500	intensité variabilité n(allèles) n(individu)	++	F	++	++	++	++	++	++	++	++	- (dupliq.)	- (dupliq.)	- (dupliq.)	- (dupliq.)	- (dupliq.)	- (dupliq.)	- (dupliq.)	- H	H	- F
			16	5	5	5	5	5	5	5	6	5	6	5	1	5	4	2	2	5	4	3
UNH-135	R 48/2/30 4500	intensité variabilité n(allèles) n(individu)	++ H (écho) 6	++ H (écho) 6	++ H (écho) 6	++ H (écho) 4	++ H (écho) 2	++ H (écho) 9	++ H (écho) 8	++ H (écho) 3	++ H (écho) 4	++ H (écho) 7	++ H 3	++ F 1	++ H 2	++ H 3	++ H 5	++ H 2	++ H 3	?	?	+
			16	5	5	5	5	5	5	5	6	5	6	5	1	5	4	2	2	5	5	2
UNH-138	R 46/2/30 4500	intensité variabilité n(allèles) n(individu)	++	F	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	- (dupliq.)	?	++ F
			16	1	1	8	2	8	8	3	2	10	5	4	1	3	5	2	2			1
UNH-142	F 46/1,5/30 4500	intensité variabilité n(allèles) n(individu)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	?	+
			16	4	1	5	1	8	6	1	2	4	2	1	1	1	7	4	3	F		2
UNH-146	F 58/1,2/30 3500	intensité variabilité n(allèles) n(individu)	++	++	++	++		++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-	++	-
			16	1	1	1	1	6	4	2	H (duplic.) 4	H 4	3	2	2	1	3	2	2	Compiqué	F	Compiqué
UNH-149	R 46/2/30 4500	intensité variabilité n(allèles) n(individu)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++	+
			16	1	3	8	2	7	5	3	3	H (duplic.) 10	3	3	1	7	10	4	3	5	3	2
UNH-154	R 48/1,2/30 3500	intensité variabilité n(allèles) n(individu)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	?
			16	2	4	9	2	9	9	2	3	7	6	2	2	2	3	2	2	5	1	2
UNH-159	R 53/1,2/30 6000	intensité variabilité n(allèles) n(individu)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++	+
			16	3	2	3	2	9	8	2	2	5	6	1	1	3	5	2	3	F	F	F
UNH-162	R 46/1,5/30 6000	intensité variabilité n(allèles) n(individu)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	-	++	?
			16	2	3	8	1	9	9	1	2	7	6	2	2	3	6	4	2	H	H	3
UNH-169	R 50/1,2/30 3500	intensité variabilité n(allèles) n(individu)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
			16	3	3	5	3	8	9	1	4	4	6	1	1	1	2	1	2	F	F	2
UNH-172	R 46/1,5/30 6000	intensité variabilité n(allèles) n(individu)	++	++	++	++	++	++	++	++	?	?	-	-	-	?	?	?	?	?	?	?
			5	2	5	1	1	1	2	1	4	(nul)	6	5	1	5	4	2	2	5	3	3

Annexe 5 : Résultats des tests d'amplification interspécifique pour 34 locus microsatellites clonés chez *O. niloticus* et 15 autres espèces : conditions PCR utilisées, intensité et qualité d'amplification (++ = très bonne, + = assez bonne, - = moyenne, -- = médiocre et ? = absence d'amplification), variabilité (F = fixé, H = polymorphe, dupliq = locus pouvant être dupliqué, écho = locus pouvant présenter des bandes écho, nul = présence probable d'allèles nuls), nombre allèles différents amplifiés et nombre d'individus testés.

Populations			<i>O. niloticus</i> Bouaké	<i>O. mossambicus</i> Mozambique	<i>O. aureus</i> Lac Manzalla	<i>O. shiranus</i> Malawi	<i>O. urolepis</i> hormonum Bouaké	<i>O. saka</i> Malawi	<i>O. squamipinnis</i> Malawi	<i>O. macrochir</i> mweruensis Bouaké	<i>S. melanothron</i> Lag. Ebrié	<i>S. galilaeus</i> Niger (Djk)	<i>T. zillii</i>	<i>T. zillii</i> Nil	<i>T. zillii</i> Sassandra	<i>T. dageti</i> Niger (Djk)	<i>T. guineensis</i>	<i>T. guineensis</i> Sénégal	<i>T. guineensis</i> Lag. Ebrié	<i>H. bimaculatus</i> Côte d'Ivoire	<i>C. guntheri</i> Niger	<i>H. sp.</i> "rockkrabensis" Bassin du Victoria HRK-aq
Locus	PCR-HIT	code	ON-bk	OMO-st	OA-st	OSH-mw	OUH-bk	OSA-mw	OSQ-mw	OMA-bk	SMM-eb	SGG-nb	TZ	TZ-st	TZ-sas	TD-ng	TG	TG-sg	TG-eb	HB-co	CG-nb	
UNH-173	F 54/1,2/30 4500	intensité variabilité n(allèles) n(individu)	++ H 5	++ H 2	++ H 3	?	++ F 1	++ H (nul) 4	++ H (nul) 6	++ F 1	++ H (nul) 2	++ H 6	++ F 1	++ F 1	++ F 1	+	+	+	+	?	?	?
UNH-174	F 46/1,5/30 4500	intensité variabilité n(allèles) n(individu)	++ H 4	++ H 3	++ F 1	++ H 2	++ H 2	++ F 1	++ F 1	++ F 1	++ F 1	++ H 6	++ H (duplic.) 4	++ F 1	++ H (duplic.) 3	++ F 1	++ H 3	++ F 1	++ H 2	?	?	++ F 1
UNH-189	R 48/1,2/30 4500	intensité variabilité n(allèles) n(individu)	++ H 4	++ H 2	++ H 3	++ H 7	++ H 3	++ H 7	++ H 6	++ H 2	++ H 3	++ H 7	++ H 3	++ F 1	++ H 2	++ H 7	++ H 5	++ H 2	++ H 4	?	+	+
UNH-190	R 56/1/30 4500	intensité variabilité n(allèles) n(individu)	++ H 3	++ F 1	++ F 1	++ H 8	++ F 2	++ H 4	++ H 3	++ H 2	++ F 1	++ H 2	++ H 3	++ H 3	++ H 2	?	+ ou nul 1	+ ou nul 1		?	++ F 1	+
UNH-192	R 52/1,2/30 3500	intensité variabilité n(allèles) n(individu)	++ H 3	++ H 3	++ H 2	++ F 1	++ F 3	++ H 3	++ H 5	++ F 1	++ H 3	++ H (duplic.) 10	++ H 2	++ H 2	++ F 1	++ H 7	++ H 6	++ H 4	++ H 3	+	+	++ H 2
UNH-193	R 48/2/30 3500	intensité variabilité n(allèles) n(individu)	++ H 3	++ H 2	++ H 2	++ H 2	++ H 3	-- (ou nul)	-- (ou nul)	-- (ou nul)	++ H 3	-- (ou nul)	++ H 2	++ F 1	++ F 1	++ F 1				?	-- (ou nul)	
UNH-197	R 48/1,2/30 4500	intensité variabilité n(allèles) n(individu)	++ H (écho) 4	++ H (écho) 2	++ H (écho) 2	++ H 6	++ H (écho) 2	++ H (écho) 8	++ H (écho) 9	+	++ H (écho) 4	++ H 9	++ H 4	++ H 2	++ H 2	++ H 5	++ H 5	++ H 2	++ H 2	?	+	+
UNH-207	R 58/1,2/30 3500	intensité variabilité n(allèles) n(individu)	++ H (écho) 3	++ H 2	++ F 1	++ F 1		++ H 5	++ H 8	++ F 1	++ H (écho) 4	++ H (duplic.) 10	++ H 4	++ H 2	++ H 2	++ H 3	++ H 5	++ H 2	++ H 3	?	++ F 1	+
UNH-211	R 46/2/30 3500	intensité variabilité n(allèles) n(individu)	++ H 7	++ H 2	++ H 2	++ H 7	++ F 1	++ H 8	++ H 8	++ H 2	++ H 5	++ H 5	++ H 2	++ H 2	++ H 2	--	++ H 4	++ F 1	++ H 3	--	--	--
UNH-216	R 50/1,2/30 3500	intensité variabilité n(allèles) n(individu)	++ H 4	++ H 2	++ F 1	++ H 7	++ H 3	++ H 6	++ H 8	++ F 1	++ H 4	++ H 7	++ H 2	++ F 1	++ F 1	++ H 7	++ H 5	++ F 1	++ H 4	+	--	++ H 2

Annexe 6 : liste des ségrégations informatives déterminées après typage des parents des quatre fratries BackCross et de la fratrie pure *S. melanotheron* ; en grisé les ségrégations non-informatives, N= *Oreochromis niloticus* , M= *Sarotherodon melanotheron* , F1= (*O. niloticus* x *S. melanotheron*), F'1= (*S. melanotheron* x *O. niloticus*), m= mâle, f= femelle et mutation= ségrégation présentant des allèles mutées dans la descendance.

Familles		BC2	BC3	BC5bls	BC9	L4-Melano
Locus	groupe de liaison	F1 x N	N x F1	F'1 x N	N x F'1	M x M
UNH-008	17			m=homozygote	f=homozygote	non informatif
UNH-102	16	m=homozygote			f=homozygote	
UNH-103	17		m=allèle nul =>inexploitable	m=homozygote	m=allèle nul	non informatif
UNH-106	14	f=allèle nul =>inexploitable	f=homozygote m=allèle nul	non informatif		non informatif
UNH-115	3	m=homozygote	f=homozygote		f=homozygote	fixé
UNH-117		m=homozygote	f=homozygote	fixé	fixé	non informatif
UNH-123	12					f=homozygote
UNH-124			f=mutation		f=homozygote	fixé
UNH-125	16					
UNH-129	8	m=homozygote			m=homozygote	
UNH-130	23	f=allèle nul	non interprétable	f=homozygote		non informatif
UNH-131	3		f=homoz m=allèle nul		f=homozygote	f=homozygote
UNH-132	9		f=homozygote	m=homozygote	f=homozygote	non informatif
UNH-135	3		f=homozygote		f=homozygote	
UNH-138	16				f=mutation	f=homozygote
UNH-142					f=homozygote	m=homozygote
UNH-146	4		f=homozygote		f=homozygote	fixé
UNH-149	5	m=homozygote	f=homozygote			non informatif
UNH-154	6			m=homozygote	m=homozygote	
UNH-159	2				f=homozygote	non informatif
UNH-162	19	m=homozygote				f=homozygote
UNH-169	10	m=homozygote	f=homozygote	m=homozygote		f=homozygote
UNH-173	13	non informatif	f=homozygote	fixé	f=non informative	m=homozygote
UNH-174	20	m=homozygote	f=homozygote		f=homozygote	fixé
UNH-189	12			m=homozygote	f=homozygote	m=homozygote
UNH-190	21		f=homozygote		f=homozygote	non informatif
UNH-197	23	m=homozygote f=allèle nul	m=allèle nul	f=allèle nul =>inexploitable	f=homozygote	
UNH-207		m=homozygote		m=homozygote		
UNH-211	30	m=homozygote		f=mutation		
UNH-216	23		f=homozygote	m=homozygote	f=homozygote	

Annexe 7 : Distorsions de ségrégation observées dans les fratries *BackCross* et mono-spécifique ; sont données les valeurs de KHI2 et de la probabilité associée ; les cases vierges montrent des distorsions non significatives, en grisé des ségrégations non-testables, (-N) : perte d'allèles *O. niloticus* , (-M) : perte d'allèles *S. melanotheron*.

Locus	groupe de Liaison	BC2		BC3		BC5bls		BC9		L4-Mel	
		Femelle (NM)	Mâle (Nilo)	Femelle (Nilo)	Mâle (NM)	Femelle (MN)	Mâle (Nilo)	Femelle (Nilo)	Mâle (MN)	Femelle (Melan)	Mâle (Melano)
UNH-008	17			5,21 a<2,5%					(-N) 10,02 a<0,5%		
UNH-102	16										
UNH-103	17										
UNH-106	14										
UNH-115	3										
UNH-117											
UNH-123	12										
UNH-124				4,33 a<5%							
UNH-125	16				(-M) 5,21 a<2,5%						
UNH-129	8										
UNH-130	23										
UNH-131	3										
UNH-132	9								(-N) 4,67 a<5%		
UNH-135	3									8,23 a<0,5%	
UNH-138	16										
UNH-142											
UNH-146	4								(-N) 6,63 a<2,5%		
UNH-149	5					(-M) 3,97 a<5%					
UNH-154	6										
UNH-159	2										
UNH-162	19					(-N) 6,63 a<2,5%					
UNH-169	10										
UNH-173	13										
UNH-174	20				(-N) 6,63 a<2,5%						
UNH-189	12										
UNH-190	21				(-N) 5,21 a<2,5%						
UNH-197	23								(-N) 6,63 a<2,5%		
UNH-207											
UNH-211	30				(-N) 8,23 a<0,5%						
UNH-216	23								(-N) 10,02 a<0,5%		

Annexe 8 (suite): test de conformité de la méiose hybride F₁ par rapport à une ségrégation mendélienne : conservation ou perte préférentielle d'allèles de l'un des génomes ; Nilo=allèle *O. niloticus* (taille et effectif), Melano=allèle *S. melanotheron* (taille et effectif) ; résultats des test de KHI2 de conformité et test des signes.

BC5bis								
Locus	groupe de Liaison	Femelle (F ₁)						
		Nilo		Melano		[différence]	[écart moy.]	signe
UNH-008	17	208	24	224	24	0	1	
UNH-102	16	147	25	151	25	0	0	
UNH-103	17	210	26	208	24	2	1	1
UNH-115	3	140	26	124	24	2	1	1
UNH-123	12	174	21	153	29	8	4	-1
UNH-124		313	25	310	24	1	0	1
UNH-125	16	134	24	142	26	2	1	-1
UNH-129	8	211	24	213	26	2	1	-1
UNH-131	3	303	27	lent	21	6	2	1
UNH-132	9	122	24	101	26	2	1	-1
UNH-135	3	144	27	206	23	4	2	1
UNH-138	16	170	25	162	25	0	0	
UNH-142		158	26	146	24	2	1	1
UNH-146	4	123	24	121	26	2	1	-1
UNH-149	5	159	32	163	18	14	7	1
UNH-159	2	247	24	217	26	2	1	-1
UNH-162	19	216	16	210	34	18	9	-1
UNH-169	10	166	27	144	23	4	2	1
UNH-174	20	173	27	151	23	4	2	1
UNH-189	12	182	21	161	29	8	4	-1
UNH-190	21	177	21	145	29	8	4	-1
UNH-207		154	22	124	28	6	3	-1
UNH-211	30	162	19	193	30	11	6	-1
UNH-216	23	126	26	142	24	2	1	1
n (locus)		24						

Test Khi2 global :
 observé Snilo: 583 Smel: 611 ntot 1194
 théorique 597 597
 Khi2 = 0,49
 P = 0,48

Test des Signes :
 n(+) = 10
 n = 21 n(-) = 11
 P = > 0,05

BC9								
Locus	groupe de Liaison	Mâle (F ₁)						
		Nilo		Melano		[différence]	[écart moy.]	signe
UNH-008	17	208	14	218	36	22	11	-1
UNH-102	16	147	30	157	20	10	5	1
UNH-103	17	210	26	nul	24	2	1	1
UNH-106	14	135	25	nul	25	0	0	
UNH-115	3	128	21	124	29	8	4	-1
UNH-123	12	212	27	153	23	4	2	1
UNH-124		313	21	310	29	8	4	-1
UNH-131	3	500	20	400	27	7	5	-1
UNH-132	9	122	17	100	32	15	8	-1
UNH-135	3	274	21	206	29	8	4	-1
UNH-142		156	19	146	31	12	6	-1
UNH-146	4	129	16	133	34	18	9	-1
UNH-149	5	159	29	177	21	8	4	1
UNH-159	2	247	19	217	31	12	6	-1
UNH-162	19	216	22	181	28	6	3	-1
UNH-169	10	166	27	144	23	4	2	1
UNH-173	13	172	24	154	25	1	1	-1
UNH-174	20	173	25	152	25	0	0	
UNH-189	12	182	25	157	25	0	0	
UNH-190	21	177	24	145	26	2	1	-1
UNH-197	23	168	16	nul	34	18	9	-1
UNH-207		154	24	124	26	2	1	-1
UNH-216	23	138	14	146	36	22	11	-1
n (locus)		23						

Test Khi2 global :
 observé Snilo: 506 Smel: 639 ntot 1145
 théorique 573 573
 Khi2 = 11,6
 P = 0 (<0,001) donc il n'y a pas équipartition entre les allèles des 2 espèces

Test des Signes :
 n(+) = 5
 n = 20 n(-) = 15
 P = 0,05
 donc perte allèles Melano

Annexe 9 : déséquilibres de liaison observés et attendus d'après la carte génétique de *O. niloticus* dans les fratries analysées ; le groupe de liaison (LG) et la distance (en cM) sont tirés de Kocher *et al.* (1998), le type de liaison : (Attendu) par rapport à la carte génétique, (Nouveau) entre marqueurs assignés auparavant à des groupes de liaison différents et () pour l'assignation d'un nouveau marqueur à un groupe de liaison préexistant ; (Tx Rec) taux de recombinaison (NT=non testable) et (Lod) LOD score ; en gras les déséquilibres significatifs.

Données provenant de la carte génétique <i>O. niloticus</i> femelle (Kocher et al., 1998)						BC2				BC3				BC5bis				BC9				L4-Mel			
1er Locus	LG	2nd Locus	LG	Distance (cM)	Type	Femelle (F1)		Mâle (Nilo)		Femelle (Nilo)		Mâle (F1)		Femelle (F'1)		Mâle (Nilo)		Femelle (Nilo)		Mâle (F'1)		Femelle (Melano)		Mâle (Melano)	
						Tx Rec	Lod	Tx Rec	Lod	Tx Rec	Lod	Tx Rec	Lod	Tx Rec	Lod	Tx Rec	Lod	Tx Rec	Lod	Tx Rec	Lod	Tx Rec	Lod	Tx Rec	Lod
UNH 008	17	UNH 103	17	5	Attendu	0,4200	0,28	0,4200	0,28	0,4600	0,07	NT		0,3542	0,90	NT		NT		0,4200	0,28	NT		NT	
UNH 008	17	UNH 124				0,1020	7,74	0,0816	8,73	0,1957	3,97	0,0870	7,96	0,0625	9,58	NT		NT		0,2200	3,61	NT		NT	
UNH 008	17	UNH 146	4		Nouveau	0,0800	9,00	0,0200	12,92	NT		0,0000	15,05	0,0000	14,45	NT		NT		0,0400	11,40	NT		NT	
UNH 102	16	UNH 125	16	35,8	Attendu	0,3600	0,86	NT		0,2800	2,18	0,2600	2,61	0,3000	1,79	0,3200	1,44	NT		0,3600	0,86	0,2400	3,08	0,2200	3,61
UNH 102	16	UNH 138	16	43,1	Attendu	0,3800	0,63	NT		0,2800	2,18	0,3800	0,63	0,3600	0,86	0,4000	0,44	NT		0,4130	0,30	NT		0,4600	0,07
UNH 106	14	UNH 207				NT		NT		NT		0,2400	3,08	NT		NT		0,4400	0,16	0,4200	0,28	NT		NT	
UNH 115	3	UNH 131	3	4,8	Attendu	0,1000	7,99	NT		NT		0,1000	7,99	0,0426	10,56	0,2340	3,04	NT		0,0213	12,05	NT		NT	
UNH 115	3	UNH 135	3	2,4	Attendu	0,0200	12,92	NT		NT		0,0400	11,40	0,0200	12,92	0,0200	12,92	NT		0,0000	15,05	NT		NT	
UNH 117		UNH 149	5			0,0208	12,34	NT		NT		0,0000	15,50	NT		NT		NT		NT		NT		NT	
UNH 123	12	UNH 189	12	4,9	Attendu	0,1200	7,08	0,2400	3,08	0,1224	6,84	0,1837	4,60	0,2000	4,19	NT		NT		0,1200	7,08	NT		NT	
UNH 124		UNH 146	4			0,0612	9,85	0,1020	7,74	NT		0,0870	7,96	0,0612	9,85	0,1020	7,74	NT		0,1800	4,82	NT		NT	
UNH 125	16	UNH 138	16	7,3	Attendu	0,0200	12,92	0,0800	9,00	0,0000	15,05	0,1200	7,08	0,0600	10,12	0,0800	9,00	0,0000	13,85	0,0436	10,27	NT		0,2400	3,08
UNH 130	23	UNH 197	23	55,5	Attendu	0,4600	0,07	NT		NT		NT		NT		0,2800	2,18	NT		0,4800	0,02	NT		NT	
UNH 130	23	UNH 216	23	31,9	Attendu	0,3265	1,31	0,0204	12,63	NT		NT		NT		NT		NT		0,4400	0,16	NT		NT	
UNH 131	3	UNH 135	3	2,4	Attendu	0,0800	9,00	0,0400	11,40	NT		0,0600	10,12	0,0213	12,05	0,2128	3,58	NT		0,0213	12,05	NT		0,0408	11,12
UNH 154	6	UNH 207				0,0200	12,92	NT		0,0200	12,92	0,0200	12,92	0,0400	11,40	NT		0,0200	12,92	NT		0,0000	14,75	0,0408	11,12
UNH 197	23	UNH 216	23	23,6	Attendu	0,2245	3,42	NT		NT		0,2000	4,19	NT		NT		NT		0,0800	9,00	0,1250	6,80	0,0833	8,47

Annexe 10 : tests de comparaison des taux de recombinaisons observés chez les individus purs et hybrides ; pour chaque comparaison le nombre de degré de liberté (ddl), la valeur du KHI2 et la probabilité associée (P) sont donnés.

Données provenant de la carte génétique <i>O. niloticus</i> femelle (Kocher et al., 1998)						Global			Comparaison F (Nilo)			Comparaison M (Nilo)			Compar.M+F (Nilo)			Compar.M+F (Melano)			Compar M/F Hyb F1			Compar M/F Hyb F'1		
1ier Locus	LG	2nd Locus	LG	Distance (cM)	Type	ddl	Khi2	P	ddl	Khi2	P	ddl	Khi2	P	ddl	Khi2	P	ddl	Khi2	P	ddl	Khi2	P	ddl	Khi2	P
UNH 008	17	UNH 103	17	5	Attendu	4	1,16381	0,88402							1	0,41551	0,51919							1	0,7438	0,38845
UNH 008	17	UNH 124				5	9,62679	0,08653							1	2,94194	0,08631				1	0,84485	0,35801	1	5,84	0,01567
UNH 008	17	UNH 146	4		Nouveau	4	8,10888	0,08767													1	6,33864	0,01181	1	1,6469	0,19938
UNH 102	16	UNH 125	16	35,8	Attendu	7	4,62686	0,70539							1	0,19048	0,66252	1	0,05647	0,81217	1	1,16877	0,27965	1	0,40706	0,52347
UNH 102	16	UNH 138	16	43,1	Attendu	6	3,85426	0,69639							1	2,25569	0,13312				1	0,00096	0,97532	1	0,29192	0,589
UNH 106	14	UNH 207				2	5,22488	0,07336																		
UNH 115	3	UNH 131	3	4,8	Attendu	4	14,3955	0,00613													1	0,00019	0,98894	1	4,91913	0,02656
UNH 115	3	UNH 135	3	2,4	Attendu	4	2,04082	0,72825													1	1,02041	0,31242	1	1,02041	0,31242
UNH 117		UNH 149	5			1	1,05241	0,30495													1	1,05241	0,30495			
UNH 123	12	UNH 189	12	4,9	Attendu	5	4,73613	0,44892							1	2,70685	0,09992				1	0,85045	0,35643	1	1,17883	0,27759
UNH 124		UNH 146	4			5	5,3151	0,37865				1	0,00814	0,92811							1	0,87332	0,35004	1	4,43366	0,03624
UNH 125	16	UNH 138	16	7,3	Attendu	8	32,9113	6,4E-06	1	7,49268	0,0062	1	0,08605	0,76926	3	7,57873	0,05557				1	3,7312	0,0534	1	0,68732	0,40708
UNH 130	23	UNH 197	23	55,5	Attendu	2	5,02855	0,08092																		
UNH 130	23	UNH 216	23	31,9	Attendu	2	23,9489	6,3E-06																		
UNH 131	3	UNH 135	3	2,4	Attendu	6	20,2306	0,00252				1	16,2993	5,4E-06										1	3,20466	0,07343
UNH 154	6	UNH 207				6	2,5701	0,66054	1	0,03976	0,84194							1	1,84634	0,17421	1	0,03976	0,84194			
UNH 197	23	UNH 216	23	23,6	Attendu	4	7,12722	0,12932										1	1,51389	0,21855	1	4	0,0455			